

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BLIDA 1

FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA NATURE

جامعة البليدة 1

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم بيولوجيا تجمعات الكائنات الحية

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ORGANISMES

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme Master II en Biologie  
Option : Génomique et Biotechnologie végétale.

## Thème

**Induction et caractérisation biochimique de chevelu  
racinaire de *Zygothymum album* par co-culture via  
*Agrabacterium rhizogenes*.**

Soutenu publiquement le 30 juin 2016

**Présenté par :**

Mme. ZAIDI Hiba

Mr. MASMOUDI Zakaria

**Devant le Jury :**

**Présidente :** Mme. FAIDI H.

MAA/BPO BLIDA 1

**Examinatrice :** Mme. CHAICHI W.

MAA/BPO BLIDA 1

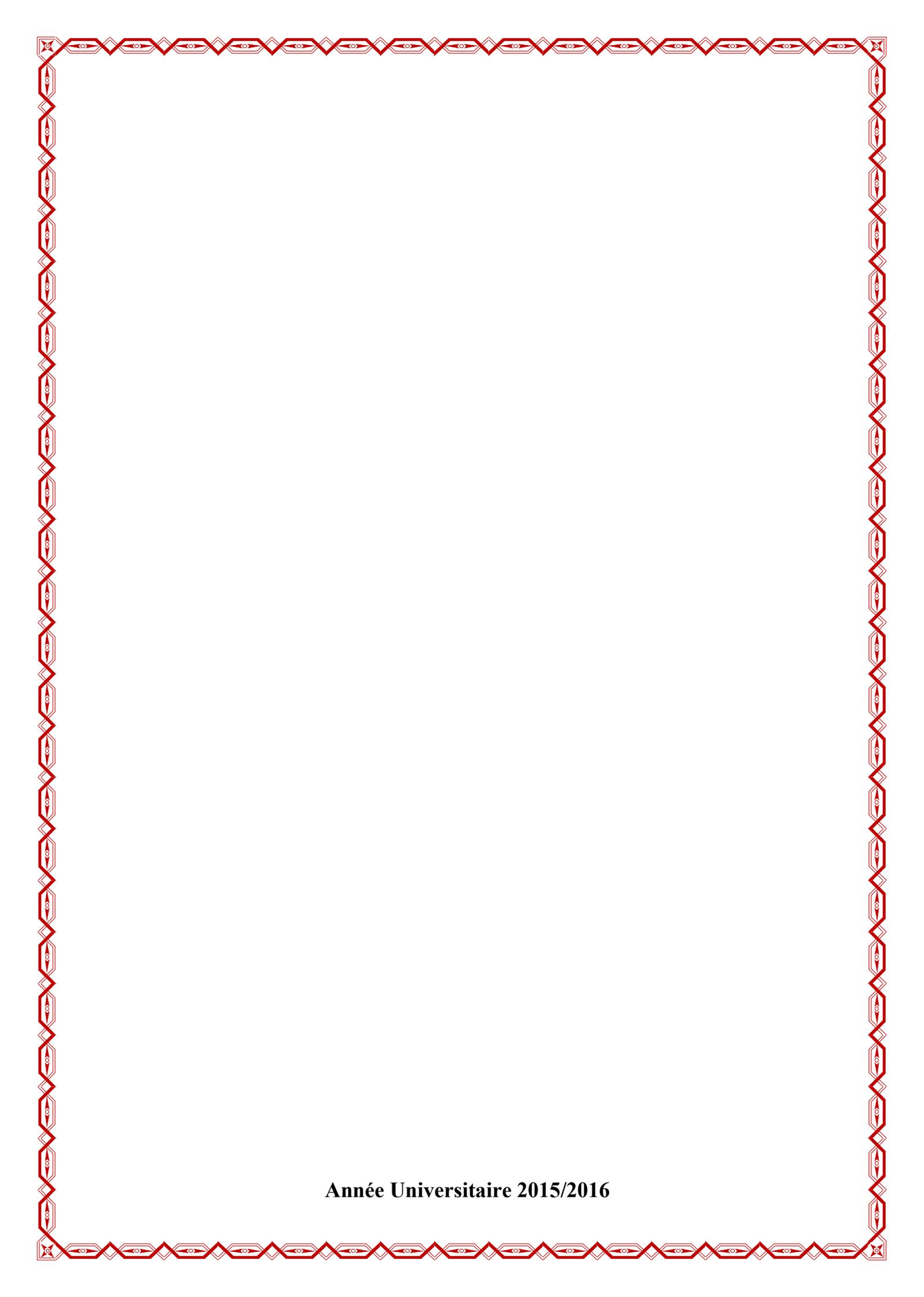
**Promotrice :** Mme. AYADI R.

MCB/BPO BLIDA 1

**Co-Promoteur :** M. AMDOUN R.

MRA A/INRF

Année Universitaire 2015/2016



**Année Universitaire 2015/2016**

## *Dédicaces*

*Avec un grand amour, je tiens à dédier ce modeste travail à :  
Celui qui a été toujours présent pour me soutenir et me conseiller,  
pour son affection, sa gentillesse, ces encouragements et ses sacrifices  
sans limite ..... Mon très chère papa Abdelkader que j'aime et je  
respecte tant.*

*Celle qui ma élevé et éduqué afin que j'atteigne ce niveau, pour son  
amour débordant, sa tendresse, sa patience et son sacrifice ainsi que  
sa gentillesse ..... Ma très chère maman Fatma que j'aime beaucoup.*

*A celui qui a été toujours à mes côtés, Mon très cher mari Karim en  
signe de reconnaissance pour sa patience, sa compréhension, sa  
gentillesse et son aide, qu'il trouve ici mes sincères sentiments  
d'amour et de respect.*

*A mes éclats de joie ; mes enfants : Sami, Wassim, et Yacine.  
Mes chère frères Tarek et Mohamed, auxquels je leur souhaite  
beaucoup de réussite et de joie dans leur vies.*

*Ma très chère sœur Houda et ma petite et adorable sœur Hana.*

*A ma meilleure amie qui m'a porté chance : Amel Kanane  
A mes responsables à la Direction de Marketing et de l'Information*

*Médicale : Dr Neili*

*Dr Ben Younes, Dr Dahmene et Dr Tafer.*

*A tous mes amis.*

*A tous mes enseignants.*

*Hiba*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers parents, qui n'ont jamais cessé de m'encourager et de veiller à mon instruction et à mon éducation, puisse Dieu leur prêter longue vie.*

*A tous les autres membres de la famille qui m'ont soutenu de près ou de loin et qui m'ont souhaité toujours la réussite et le bonheur, surtout mon épouse *NAWAL* et ma frangine *YASMINA*.*

*A tous ceux qui ont partagé avec moi les longues années d'études et ont créé la joie et la bonne entente.*

*A tous mes amis que j'ai connus depuis mon enfance.*

*Zakaria*

# Remerciements

*Nous tenons à remercier tout d'abord ALLAH, le tout puissant de nous avoir illuminé et ouvert les portes de savoir et nous avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce travail.*

*Ce modeste travail n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes.*

*Nous tenons à remercier profondément :*

*Madame FAIDI. H Maitre assistante A à l'université Blida 1 pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider notre jury.*

*Notre promotrice Madame AYADI. R Maitre de conférence à l'université Blida 1 et Notre co-promoteur Monsieur AMDOUN. R Maitre de recherche A à l'INRF pour leurs aides, leur bienveillance, leur générosité et leurs précieux conseils durant la réalisation de ce mémoire.*

*Madame CHAICHI Maitre assistante à l'université Blida 1 d'avoir accepté d'examiner ce travail et participé à ce jury.*

*Monsieur Zandouche. O, le Directeur Général de l'Institut National de Recherche Forestière (INRF), de nous avoir facilité la réalisation de ce modeste travail.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à Monsieur KEBBAB technicien au laboratoire in vitro à l'INRF ainsi qu'à tous ceux qui nous ont aidés à réaliser ce modeste travail.*

*Nos sincères remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants que nous avons rencontrés tout au long de notre formation au niveau de l'université SAAD DAHLEB de Blida.*

*Enfin, il nous tient à cœur d'exprimer notre reconnaissance à toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Liste des abréviations

**CCD** : Central Composit Design.

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**CRs** : chevelus racinaire

**DO<sub>600</sub>** : densité optique mesurée à une longueur d'onde  $\lambda = 600$  nm.

**HCl** : Chlorure d'hydrogène

**Kp** : Kilo bases

**MS** : Milieu de culture Murashige et Skoog.

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de sodium

**NH<sub>4</sub>OH** : Ammoniaque

**Pb** : Paire de bases

**YEB** : Yeast Extract Broth

**YEM** : Yeast Extrait Mannitol

***Y<sub>Réac.</sub>*** : Taux de réactivité.

***Y<sub>Rdt</sub>*** : Rendement des CRs induits.

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Composition du milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962)

**Tableau 2.** Composition du milieu YEM (Vincent, 1970).

**Tableau 3.** Différents traitements et niveaux des facteurs étudiés en valeurs codées et réelles.

**Tableau 4.** Résultats de l'application du CCD.

**Tableau 5.** Teneur en alcaloïdes totaux de deux lignées de CRs.

## Liste des figures

**Figure 1.** *Zygophyllum album* L.

**Figure 2.** Organisation du plasmide Ri.

**Figure 3.** Mécanismes moléculaires du transfert de l'ADN-T.

**Figure 4.** Activation de la souche A<sub>4</sub>.

**Figure 5.** Protocole de préparation des suspensions bactériennes.

**Figure 6.** Méthode de l'infection, de la co-culture et de l'isolement des racines induites.

**Figure 7.** Exemple de domaine de variation du facteur 1 ( $X_1$ ) : Saccharose.

**Figure 8.** Plan d'expérience CCD et niveaux de chacun des deux facteurs ( $X_1$  : Saccharose ;  $X_2$  : pH ;  $\pm\alpha = \pm 1, 147$ ).

**Figure 9.** Protocole de l'extraction des alcaloïdes totaux selon Amdoun et al., 2009

**Figure 10.** Plantules de *Z. album* âgées de huit semaines destinées à l'infection.

**Figure 11.** Formation de cal au niveau du site d'infection des plantules de *Z. album* après 15 jours de l'infection par la souche A<sub>4</sub> d'*A. rhizogenes*.

**Figure 12.** Graphique de Pareto standardisé pour  $Y_{réac}$ .

**Figure 13.** Formation et croissance des CRs sur des explants de *Z. album* après l'infection par la souche A<sub>4</sub> d'*Agrobacterium rhizogenes*.

**Figure 14.** Graphique de Pareto standardisé pour  $Y_{rend}$ .

**Figure 15.** Contours d'isoréponse estimée de la désirabilité globale ( $D$ ) en fonction de la concentration du saccharose et du pH.

**Figure 16.** Deux lignées de CRs sélectionnées par Sahli et Gadiri (2015).

لغرض إنتاج المركبات الثانوية باستعمال الجذور الشعرية المتحصل عليها عن طريق بكتيريا *Agrobacterium rhizogenes*, والتي يمكن أن تكون تقنية واحدة مقارنة مع تقنيات الإنتاج الأخرى. قمنا بتحضير نموذج نمو الجذور الشعرية بناء على نسبة السكر و pH. من خلال دراسة نوع *Zygophyllum album* الذي ينتمي إلى عائلة *Zygophyllaceae* و يطلق عليه اسم «أغايا» والذي يمتلك خصائص طبية مهمة من خلال المركبات الثانوية التي يحتويها. التصميم التجريبي المستخدم هو Central Composit Design دراسة تأثير السكر و pH على تكوين الجذور الشعرية في عينات من *Z. album*. تبين أن لل pH تأثير على المردود بحيث يكون المردود مثالي عندما يكون pH معتدل و يقدر ب 7.17 والسكر المضاف إلى معلق البكتيريا يحسن من معدل تكوين و مردود الجذور الشعرية. لكن تفاعل السكر و pH له تأثير سلبي على مردود الجذور الشعرية وهذا التأثير هو خمس مرات أقل من التأثير الإيجابي للسكر. النماذج الرياضية المتحصل عليها سمحت بحساب القيم المثلى للسكر و pH التي هي على التوالي 36.25g/l و 6 والتي سمحت بالتحصل على حوالي 74% من التفاعلية و مردود يقدر ب 54 جذر ناتج من بين 100 عينة مصابة. و تشير النتائج إلى أن الجزء الجذري ل *Z. album* يحتوي على كمية من القلويدات ثلاث مرات أكثر من الجزء الهوائي. فصيلة callogène تحتوي على نفس كمية القلويدات الموجودة في الجذور. أما فصيلة performante فتحتوي على ضعف كمية القلويدات الموجودة في الجذور.

الكلمات المفتاح : *Zygophyllum album*, بكتيريا A<sub>4</sub>, الجذور الشعرية، الزراعة المزدوجة.

## Résumé

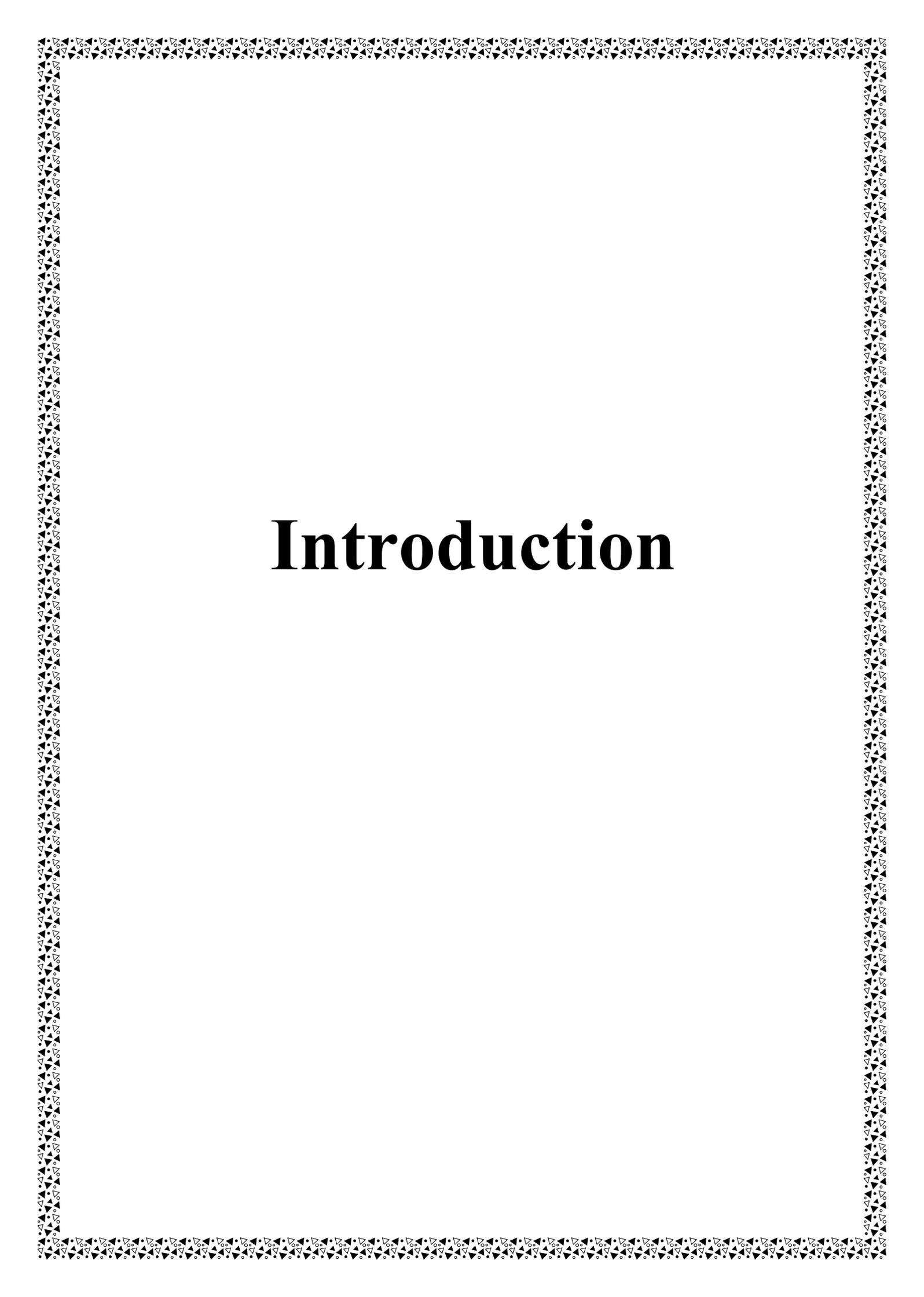
Dans un but de produire des métabolites secondaires via les chevelus racinaires, induits par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, qui pourraient être une technique prometteuse par rapport aux autres techniques biochimiques, nous avons visé à modéliser l'induction CRs en fonction du saccharose et du pH du milieu bactérien. L'étude concerne l'espèce *Zygophyllum album* de la famille de *Zygophyllaceae* appelée communément « Aggaya » et qui présente des propriétés médicinales vu sa contenance en métabolites secondaires. Le plan d'expérience appliqué est le Central Composit Design. L'étude de l'influence du saccharose et du pH du milieu bactérien sur l'induction des CRs sur des plantules de *Z. album* montre que le pH a un effet sur le rendement avec un optimum au niveau d'un pH neutre de 7,17 et le saccharose ajouté à la suspension bactérienne améliore le taux d'induction et le rendement des CRs induits. Cependant l'interaction du saccharose et du pH a un effet négatif sur le rendement des CRs, cet effet est cinq fois moins important que l'effet positif du saccharose. Les modèles mathématiques obtenus ont permis le calcul des valeurs optimales du saccharose et du pH qui sont respectivement 36,25 g/l et 6 qui permettraient d'obtenir environ 74% de réactivité et un rendement de 54 racines induites sur 100 explants infectés. Les résultats du dosage des alcaloïdes totaux montrent que la partie racinaire de *Z. album* contient environ trois fois plus d'alcaloïdes que la partie aérienne. La lignée callogène présente la même teneur en alcaloïdes que la partie racinaire. Cependant la lignée performante présente presque le double de la teneur en alcaloïdes que la partie racinaire de *Z. album*.

**Mots clés :** *Agrobacterium rhizogenes*, biotechnologie, chevelus racinaires, *Zygophyllum album* L.

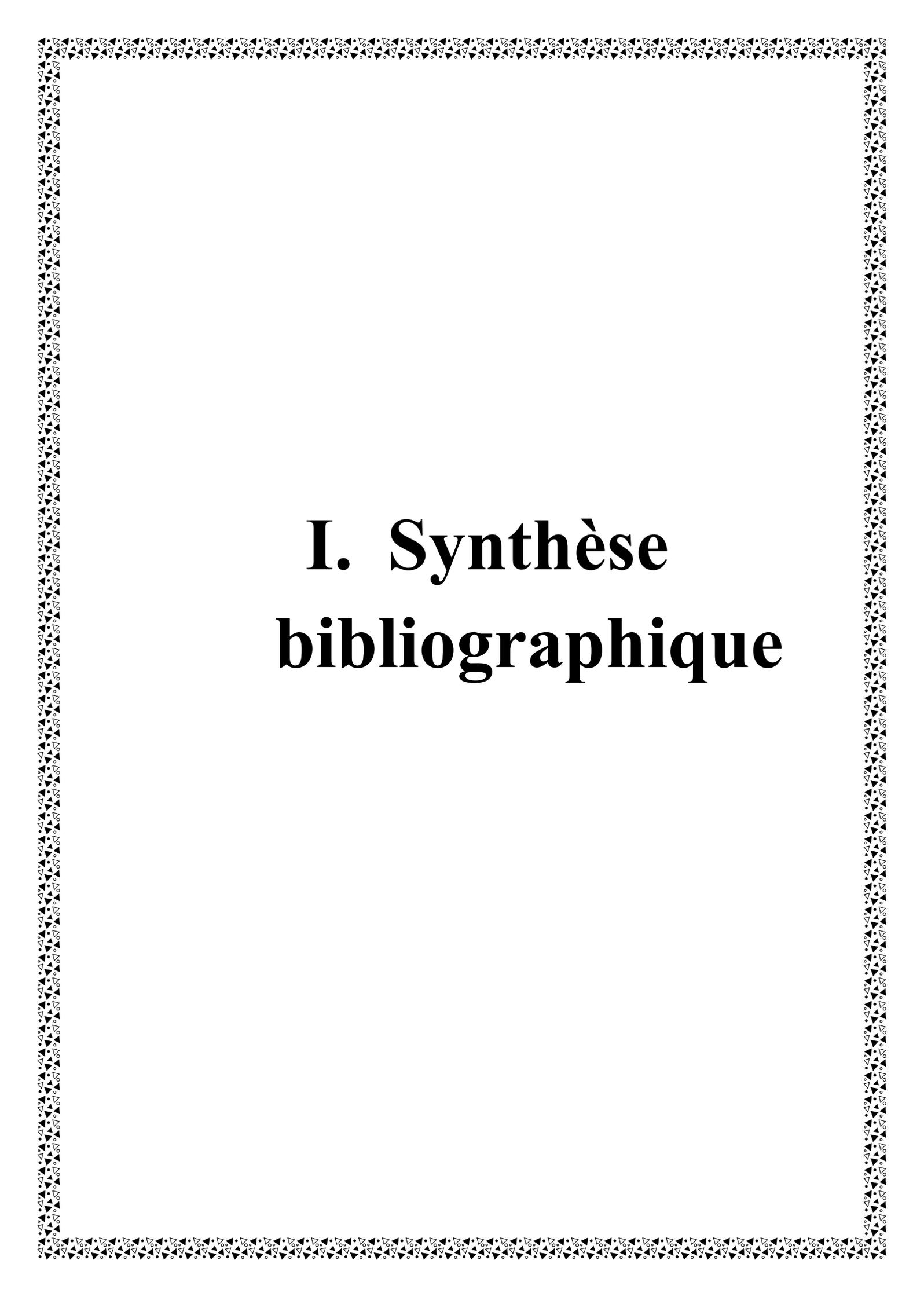
## Summary

The purpose of the production of secondary metabolites by hairy root induced by *Agrobacterium rhizogenes*, which could be a promising technique compared with other production techniques, we aimed to model the induction CRs according sucrose and pH, studying the species *Zygophyllum album* that belongs to the family of *Zygophyllaceae* commonly called "Aggaya" which has important medicinal properties for secondary metabolites that it contains. The experimental design used is the Central Composite Design. The study of the influence of sucrose and pH on the induction of CRs on *Z. album* explants shows that pH has an effect on the performance with optimum at a neutral pH of 7.17 and the sucrose added to the bacterial suspension improves the rate of induction and performance induced CRs. However the interaction of the sucrose and the pH has a negative effect on the performance of CRs, this effect is five times less than the positive effect of sucrose. The resulting mathematical models allowed the calculation of optimum values of sucrose and pH are respectively 36.25 g / l and 6 which would provide about 74% of reactivity and a yield of 54 roots induced on 100 infected explants. Results of the content of total alkaloids show that the root of *Z. album* contains about three times more alkaloids aerial part. The collagen line has the same content of total alkaloids than the root. However the performance line has almost double the content of alkaloids than the root.

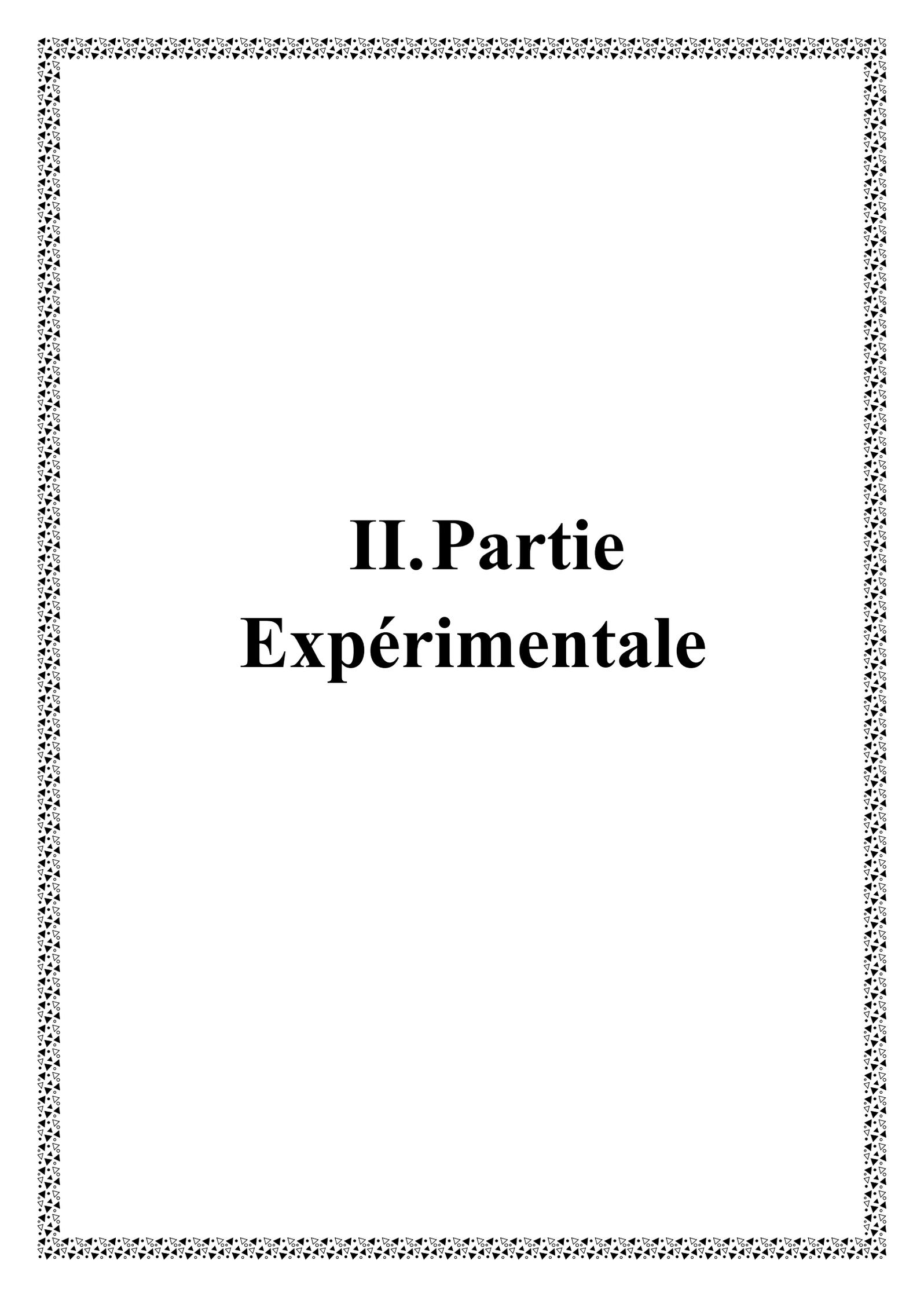
**Keywords:** *Agrobacterium rhizogenes*, biotechnology, hairy root, *Zygophyllum album* L.

A decorative border composed of a repeating pattern of small, stylized geometric shapes, including triangles and circles, arranged in a grid-like fashion around the perimeter of the page.

# Introduction

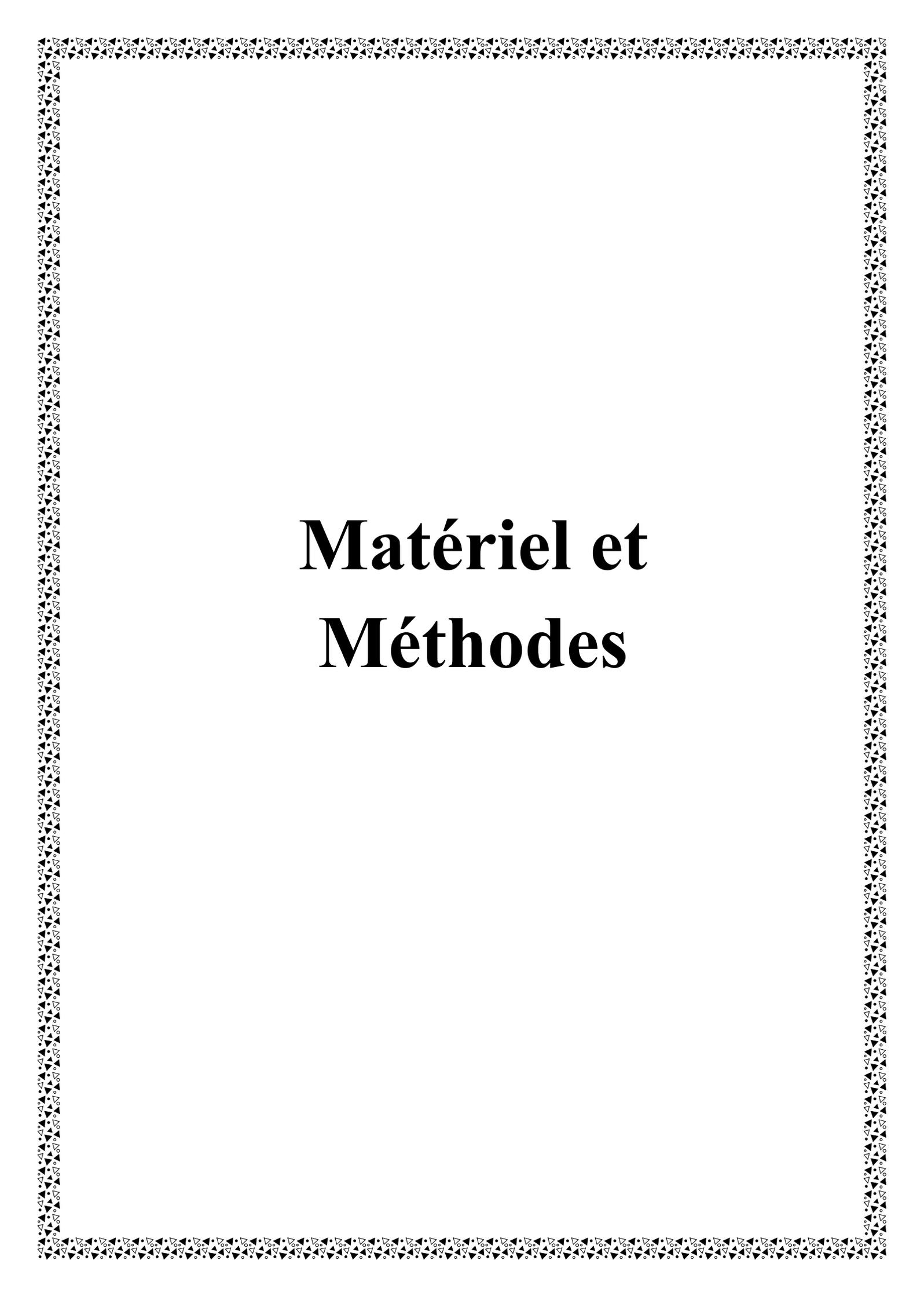
A decorative border composed of a repeating pattern of small geometric shapes, including triangles, squares, and circles, arranged in a grid-like fashion around the perimeter of the page.

# **I. Synthèse bibliographique**

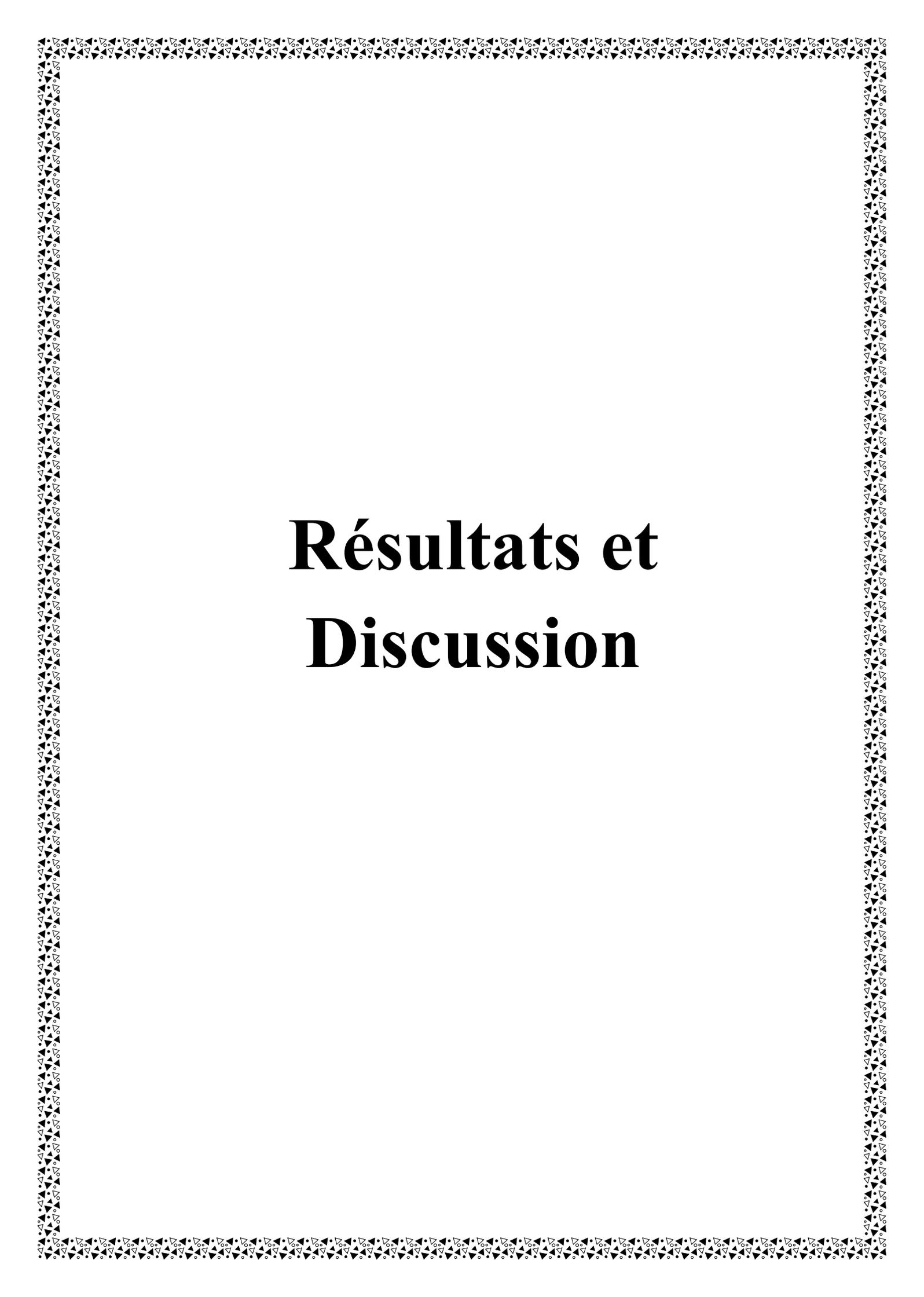


# II. Partie

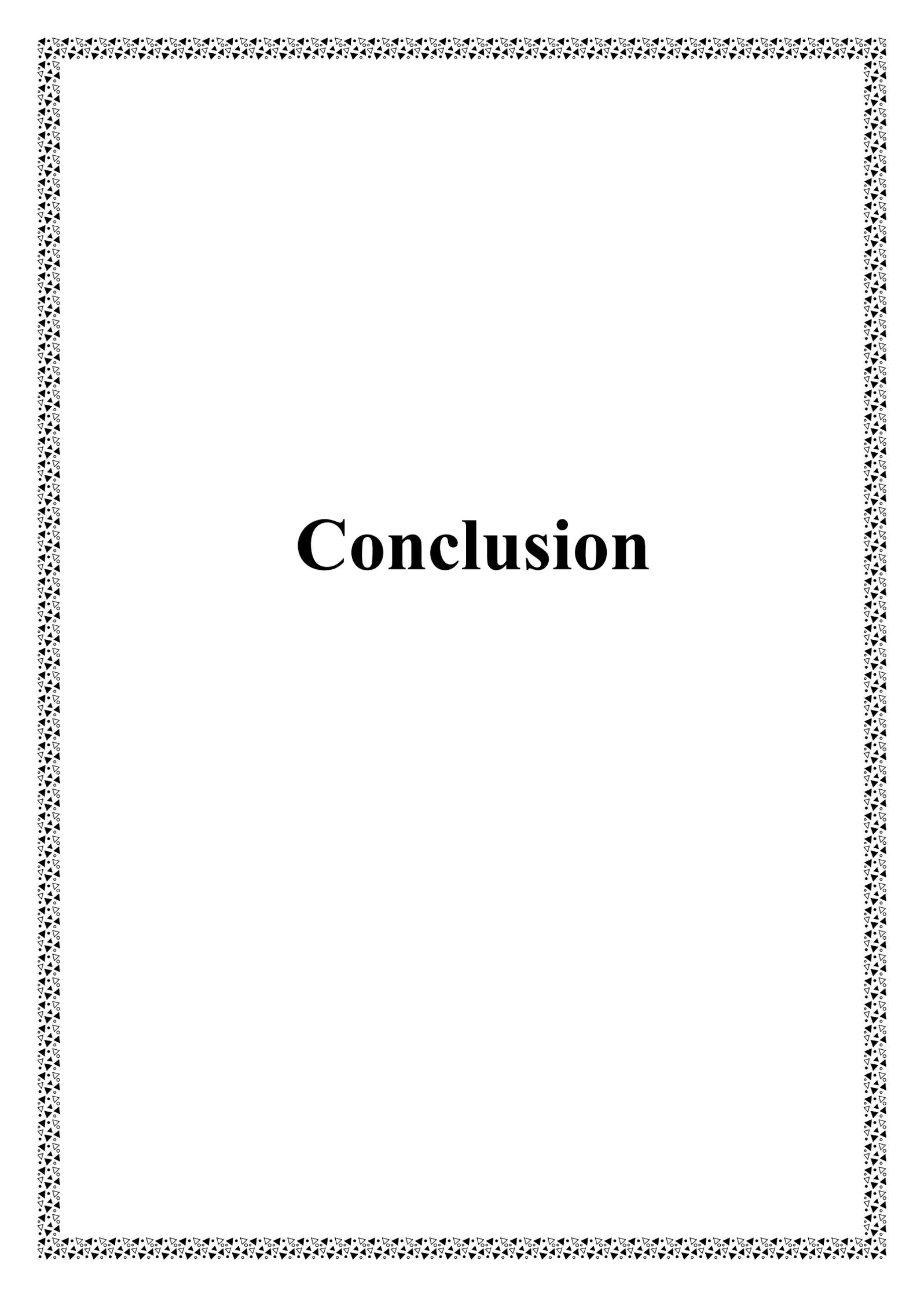
# Expérimentale

A decorative border composed of a repeating pattern of small, stylized geometric shapes, including triangles, squares, and circles, arranged in a grid-like fashion around the perimeter of the page.

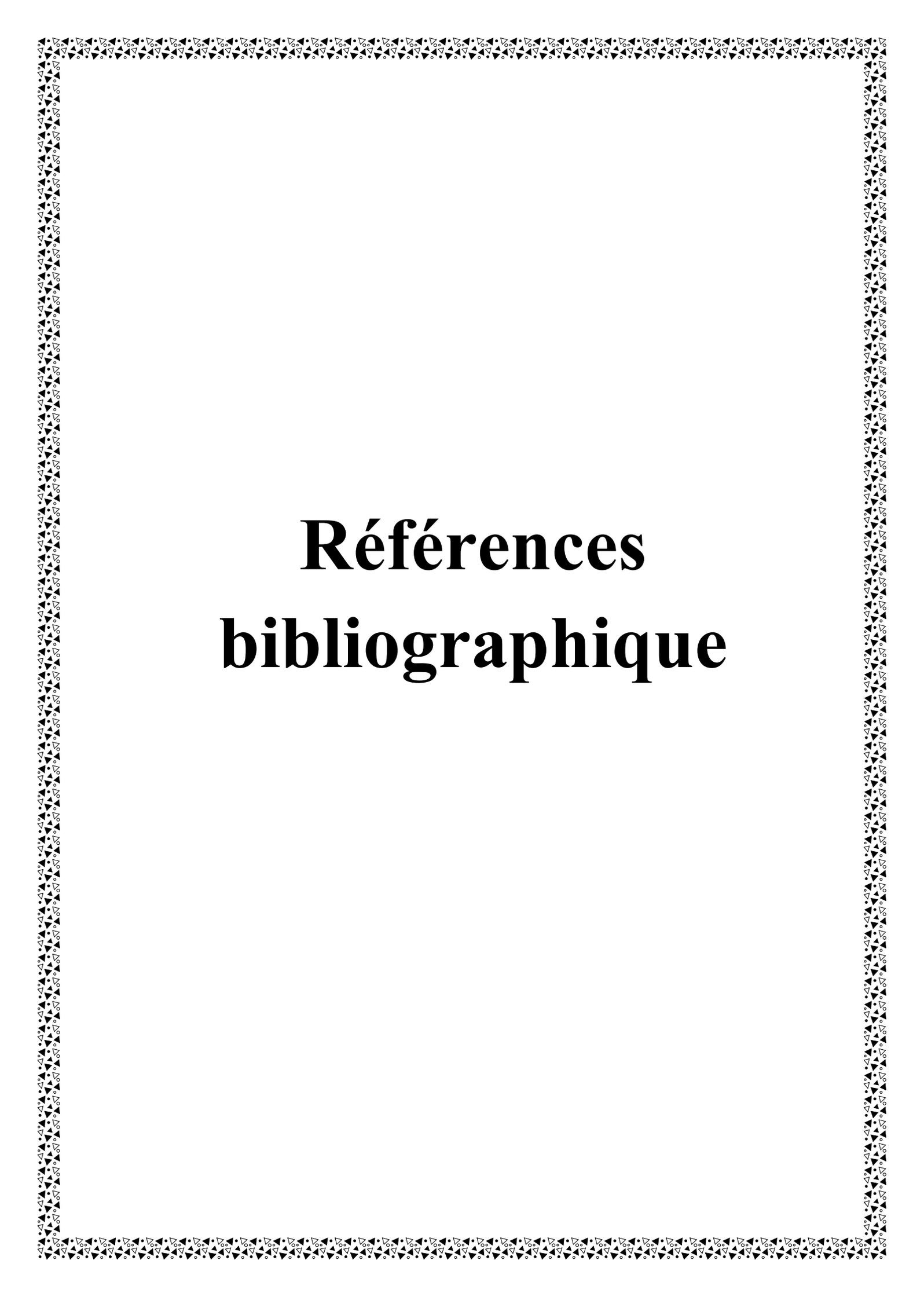
# Matériel et Méthodes

A decorative border composed of a repeating pattern of small, stylized geometric shapes, including triangles and squares, arranged in a grid-like fashion around the perimeter of the page.

# Résultats et Discussion

A decorative border composed of a repeating pattern of small, black geometric shapes, including triangles, squares, and circles, arranged in a grid-like fashion around the perimeter of the page.

# Conclusion

A decorative border composed of a repeating pattern of small, black geometric shapes (triangles, squares, and circles) arranged in a grid-like fashion, framing the central text.

# Références bibliographique

## INTRODUCTION :

Les plantes médicinales sont une importante source de métabolites secondaires utilisés en médecine humaine et vétérinaire (Sasson, 1999) parmi lesquels on cite : les hétérosides, les essences à terpènes ou à dérivés du phényl-propane (cinnamiques, etc...) et les alcaloïdes (Chopra *et al.* 1960).

Plusieurs études tentent de valoriser les effets thérapeutiques des plantes médicinales des régions arides parmi lesquelles, le *Zygophyllum album*. Cette espèce présente une grande richesse en métabolites secondaires. Elle est utilisée traditionnellement dans le Sud comme traitement antidiabétique, anti-inflammatoire, anti-diarrhéique, antimicrobien et antispasmodique (Maiza *et al.* 2003).

Les métabolites secondaires sont présents à de faible niveau d'accumulation dans la plante entière (Kinghorn et Balandrin, 1993). Leur production par synthèse chimique est onéreuse car la complexité de la structure chimique des métabolites et l'aspect polluant de ce type de production rendent parfois cette synthèse peu rentable (Kim *et al.* 2002). Le développement de procédés de production par voies biotechnologiques, en utilisant des cultures de cellules ou de tissus de plantes (cals, racines, tiges, feuilles) offrent une alternative meilleure (Verpoorte *et al.*, 1991). Ce type de procédés, permet de s'affranchir des contraintes édapho-climatiques et des risques liés aux agents pathogènes.

La biosynthèse des métabolites secondaires dans la plante est liée à la différenciation cellulaire. L'utilisation donc d'un tissu spécialisé tel que les chevelus racinaires (CRs) est prometteuse, car beaucoup de métabolites secondaires sont synthétisés au niveau des racines (Flores *et al.*, 1999).

Les CRs sont obtenus par transformation génétique via la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*. Cette dernière est une bactérie tellurique qui infecte les plantes au niveau des blessures, et transmet une partie de son ADN-T (plasmide *Ri*) aux cellules végétales des plantes supérieures. Le processus d'infection est activé

par des signaux chimiques à savoir : les composés phénoliques, les monosaccharides, tels que le glucose et le pH acide (Scriban, 1999 ; Gao et Lynn, 2005). L'infection entraîne une prolifération des racines grâce à un épisome bactérien sur le plasmide *Ri* (Tepfer, 1982 ; Scriban, 1999). La réaction de la plante à l'infection bactérienne se traduit par la formation d'un CR (*Hairy root*) (Hamill *et al.*, 1987 ; Verpoort *et al.*, 1991).

En général, les CRs sont caractérisés par une croissance rapide (Souret *et al.*, 2003 ; Kovalenko et Maliuta, 2003) et des rendements accrus en métabolites secondaires équivalents, voir supérieures à ceux de la plante-mère (Christen *et al.*, 1990 ; Hamill *et al.*, 1990 ; Sauerwein et Shimornura., 1991 ; Palazon *et al.*, 1997 ; Palazon *et al.*, 1998). La production de métabolites secondaires par les CRs a fait l'objet de nombreuses études pour diverses espèces végétales (Flores et Medina-Bolivar, 1995).

Chaque racine obtenue à l'aide de la bactérie *A. rhizogenes* peut être considérée comme une lignée à part (Dhakulkar *et al.*, 2005). La sélection des CRs performants passe donc par la maîtrise de leur production *in vitro*. En effet, l'optimisation du protocole d'obtention des CRs constitue une étape incontournable pour l'obtention d'un grand nombre de lignées racinaires, ce qui augmente les probabilités de sélection des lignées performantes

Notre travail a pour objectifs :

- 1) Etude de la sensibilité des hypocotyles de *Zygophyllum album* à la souche *A<sub>4</sub>* d'*Agrobacterium rhizogenes*.
- 2) Caractérisation phénotypique et étude statistique de l'effet du pH, du saccharose du milieu de culture bactérien, ainsi que l'effet de l'interaction des deux facteurs (saccharose X pH).
- 3) Caractérisation biochimique, en particulier, la détermination de la teneur en alcaloïdes totaux au niveau de deux lignées transformées (Callogène et

performante) obtenues par Sahli et Gadiri (2015) ainsi que la partie aérienne et racinaire de vitro-plants témoins (non transformés) de *Zygophyllum album*.

## 1.1 Modèle végétal : *Zygophyllum album* L.

Connue sous le nom de « aaggaya » en Tamahaq, *Z. album* est une espèce du genre *Zygophyllum*, de la famille des *Zygophyllaceae* (El Ghoul *et al.*, 2011). Cette famille comprend environ 27 genres et 285 espèces (Hussein *et al.*, 2011) dont 7 genres et 27 espèces sont observés en Algérie (Ozenda, 1977). C'est dernières sont très adaptées au milieu désertique par leur système racinaire horizontal (Smati, 2009). Le genre *Zygophyllum* est le plus répandu de la famille (Hussein *et al.*, 2011).

### 1.1.1. Classification et description botanique.

D'après Judd *et al.* (2002), la classification botanique de *Z. album* est la suivante:

**Règne** : Plantae

**Phylum** : Angiospermes

**Superdivision** : Spermatophyta

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Sous classe** : Rosidae II

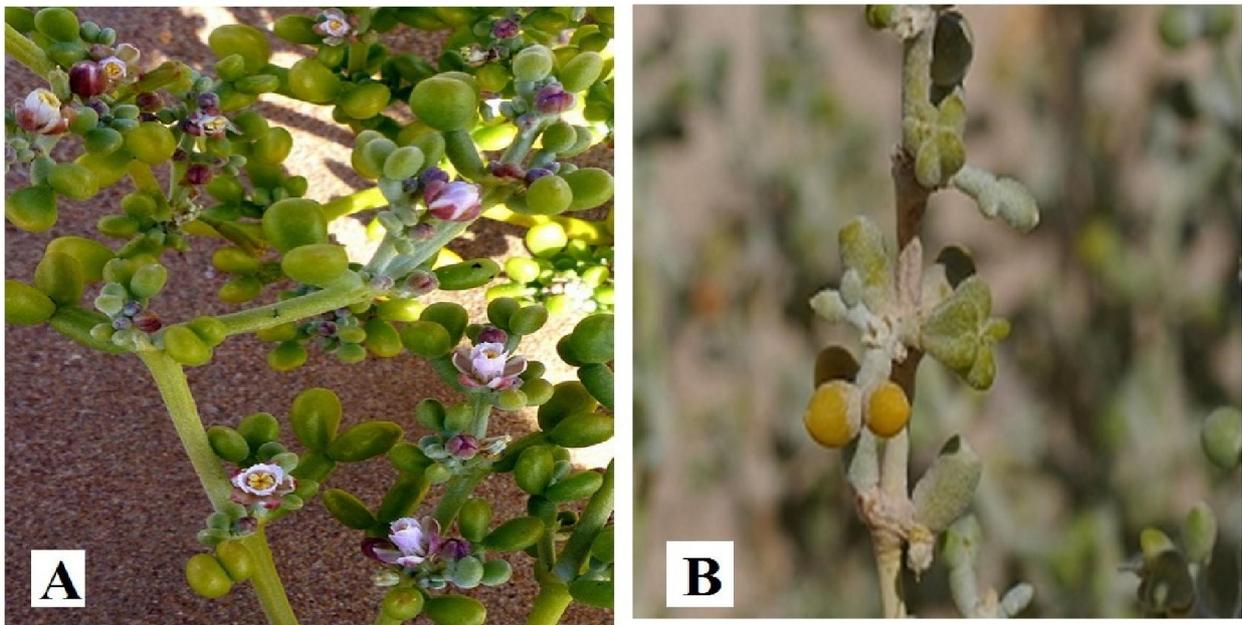
**Ordre** : Zygophyllales

**Famille** : *Zygophyllaceae*

**Genre** : *Zygophyllum*

**Espèce** : *Zygophyllum album*

L'espèce *Z. album* est un buisson ramifié mesurant 20 à 30 cm de hauteur avec des feuilles opposées succulentes. La tige présente plusieurs branches. Les fleurs (Figure 1.A) sont blanches ou jaunâtres, axillaires à base élargie possédant 10 étamines. L'ovaire anguleux à 5 lobes plus ou moins saillants. Le fruit (Figure 1.B) est une capsule portée par un pédoncule court (Smati, 2009).



**Figure 1.** *Zygophyllum album* L.

**A** : Fleurs et feuilles (Anonyme) – **B** : Fruits et feuilles (Anonyme).

### 1.1.2. Répartition géographique.

C'est une espèce saharo-méditerranéenne, abondante dans certains oueds désertiques, dans les régions salines (Hosny, 1978). En Algérie, on la trouve en pieds isolés, dans les zones sableuses peu salées et en colonies dans les sols salés. Cette espèce est commune dans tout le sud saharien notamment à Tamanrasset et Bachar (More et White, 2005). Au Sahara central, elle est signalée dans l'Ahaggar, à fort-polignac et dans la région d'El Golea (Sahki et Sahki, 2004).

### 1.1.3. Contenu en métabolites secondaires.

Plusieurs classes des métabolites secondaires sont observées chez *Z. album* telles que les terpènes, les polyphénols et les flavonoïdes.

Certains métabolites possèdent une activité anti-oxydante parmi lesquels on cite : les diterpènes phénoliques (Hill, 1993 ; Valdes., 1994), les flavonoïdes, les triterpénoides (Moustafa *et al.*, 2007 ; Ksouri *et al.*, 2013) et les polyphénol (Belguidoum *et al.*, 2015).

Beaucoup de terpènes, servant d'additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques (Tsao et coats. 1995), possèdent des activités biologiques : antimicrobienne, insecticides, anti-carcinogénique, anti-inflammatoire (Griffin *et al* ., 1999 ; Murakami *et al* ., 2004), anesthésique, antihistaminique, diurétique (Hsiou *et al.*,2000 ; Velickovie *et al.*, 2003) et neuroprotective (Hyum et Hyun, 2007). On peut citer également les propriétés anti-tumorales et cytotoxiques des diterpenes (Hill, 1993 ; Valdes, 1994).

#### **1.1.4. Intérêt Médicinal et utilisation.**

*Z. album* est efficace chez les patients souffrants de douleurs de diarrhée et est utilisé aussi comme stimulant et antispasmodique (Maiza *et al.*, 1993). En coction, en poudre ou en pommade, cette espèce est utilisée pour le traitement des indigestions et des dermatoses (Chehma., 2006). Elle possède des effets contre le diabète, l'hypertension, les maladies cardiaques (Eddouks, 2002 *in* Boumaza, 2009), le rhumatisme, la goutte et l'asthme (Amal, 2007).

#### **1.2. Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes*.**

*Agrobacterium* est une bactérie du sol, bacille gram négatif, aérobie stricte de la famille des *Rhizobiaceae* (Kerstens et De Ley, 1984). Cette famille se divise en deux genres : *Agrobacterium* et *Rhizobium*. Le genre *Agrobacterium* est pathogène pour certaines plantes, chez lesquelles il induit d'importantes modifications phénotypiques : *L'A. Tumefaciens* provoque la maladie de la galle du collet ou «Crown gall» (Smith et Townsend, 1907) alors que l'*A. Rhizogenes* est responsable de la maladie du CR ou *hairy root*, qui est une prolifération de racines au niveau des sites d'infections (Riker *et al* 1930). Cette prolifération est induite par le plasmide bactérien *Ri*.

### 1.2.1. Organisation du Plasmide *Ri* d'*A. rhizogenes*.

Le principal élément pathogène de la bactérie *Agrobacterium* est un plasmide de haut poids moléculaire d'environ 200 Kb appelé le plasmide *Ri* (*pRi* : Root-inducing) chez *A. rhizogènes* (Zambryski *et al.* 1989 ; Gaudin *et al.* 1994 ; Bonhomme *et al.*, 2000a et b). Le plasmide *Ri* (Figure 2) porte les domaines suivants (Hille *et al.* 1984) :

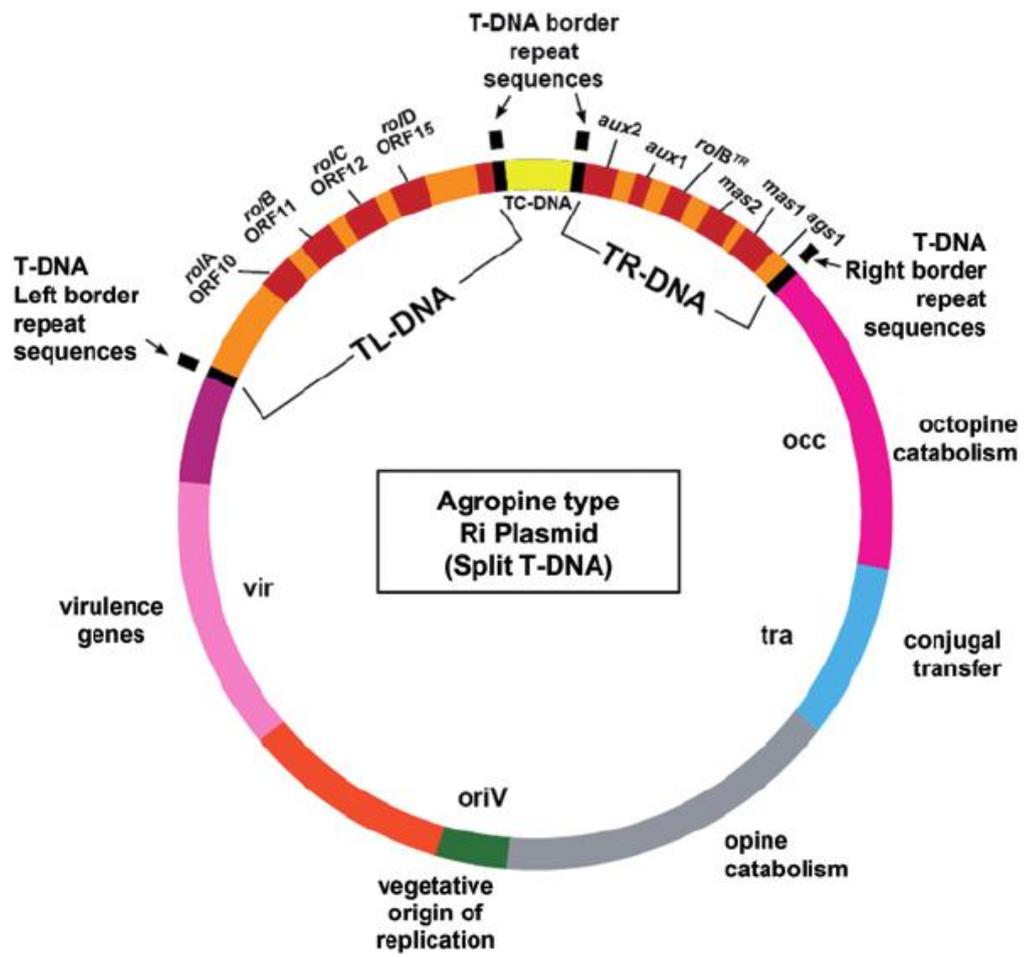
- L'origine de réplication (*ori-inc*) qui contient les fonctions nécessaires à la réplication du plasmide : l'origine de réplication (*ori*) et la région d'incompatibilité (*inc*).

Les gènes qui assurent le transfert du plasmide par conjugaison vers d'autres bactéries.

- Les gènes responsables du catabolisme des opines (*opc*).
- La région de virulence (*vir*) qui permet l'excision et le transfert de l'ADN-T. Elle regroupe huit gènes, seuls *virA* et *virG* ont l'expression constitutive. Les autres gènes ne sont induits que lorsque la bactérie est en présence d'une plante qui lui est compatible et dont les cellules libèrent des composés phénoliques inducteurs comme l'acétosyringone (Zambyski, 1992).
- L'ADN-T est la séquence transmise par l'agrobactérie à la cellule végétale. Il est délimité par deux séquences de 25 pb appelées RB (Right Border : Bordure droite) et LB (Left Border : Bordure gauche) séparées par une region non transféré.

L'ADN-TL comprend les gènes *rol A(ORF10)*, *rol B(ORF11)*, *rol C(ORF12)*, *rol D(ORF15)* et les *ORF 13 et 14 (contient 18 ORF)* responsables du phenotype (*hairy root*).

Quant à L'ADN-TR, il porte les genes *aux 1* et *aux 2* qui codent pour les enzymes impliquées dans la synthèse de l'auxine et les gènes *Ops* qui sont responsables de la production d'opines.



**Figure 2.** Organisation du Plasmide Ri (Ilkerozyigit et al., 2014)

### 1.2.2. Mécanismes moléculaires du transfert de l'ADN-T.

Le mécanisme d'infection d'*Agrobacterium* est un phénomène de transgénèse naturelle dans lequel la bactérie transforme génétiquement les cellules végétales infectées. C'est le seul cas décrit de transfert d'information génétique entre le règne bactérien et les eucaryotes. Le transfert de l'ADN-T fait intervenir à la fois des gènes chromosomiques et des gènes portés par la région du plasmide *Ri*. Le mécanisme de transfert se résume dans les étapes suivantes (Figure 3) :

**Etape 1.** Les gènes chromosomiques *chvA*, *chvB*, *pscA* et *att* jouent un rôle dans l'attachement des Agrobactéries aux cellules végétales de la plante blessée. La plante blessée émet ensuite des composés phénoliques (tels que l'acétosyringone) ou des monosaccharides qui sont reconnus par le complexe protéique transmembranaire formé de *chvE* et *VirA*. La perception de ces signaux chimiques par la bactérie, ainsi que l'acidité du milieu extérieur (pH 5 à 5,5) entraîne une phosphorylation de la protéine *VirA* (Johnson et Das, 1998).

**Etape 2.** *L'activation* : *VirA* est capable de céder son groupement phosphate à la protéine *VirG*, qui active et régule la transcription de l'ensemble des gènes *vir* (Stachel et Zambryski, 1986).

**Etape 3.** *La production* : Les gènes *vir* produisent toutes les protéines *Vir*.

**Etape 4 et 5.** L'initiation du transfert commence quand le complexe *virD1/virD2* reconnaît les séquences des bordures droites et gauches de l'ADN-T, les clivent à une distance de quatre nucléotides de leur extrémité gauche et déclenche la synthèse d'un ADN-T simple brin (Stachel et Zambryski, 1986) .

**Etape 6 et 7.** L'ADN-T (associé au *virD1* et *virD2*) avec *virE2* sont exportés à travers un appareil de transfert *virB*.

**Etape 8.** *L'intégration* : l'insertion de l'ADN-T se fait au hasard et sous forme de conjugaison illégitime dans le génome végétal (Mayer Hofer *et al.*, 1991) et ce grâce à l'intervention des gènes *virD2*, *virB* et de différentes protéines de la cellule végétale. L'ADN-T est ensuite transmis classiquement par division cellulaire aux

cellules filles (Zhu *et al* ; 2000). Les gènes de l'ADN-T seront exprimés et permettront la synthèse d'auxine, de cytokines et d'opines. La bactérie détourne ainsi la machinerie biosynthétique de la plante à son profit.

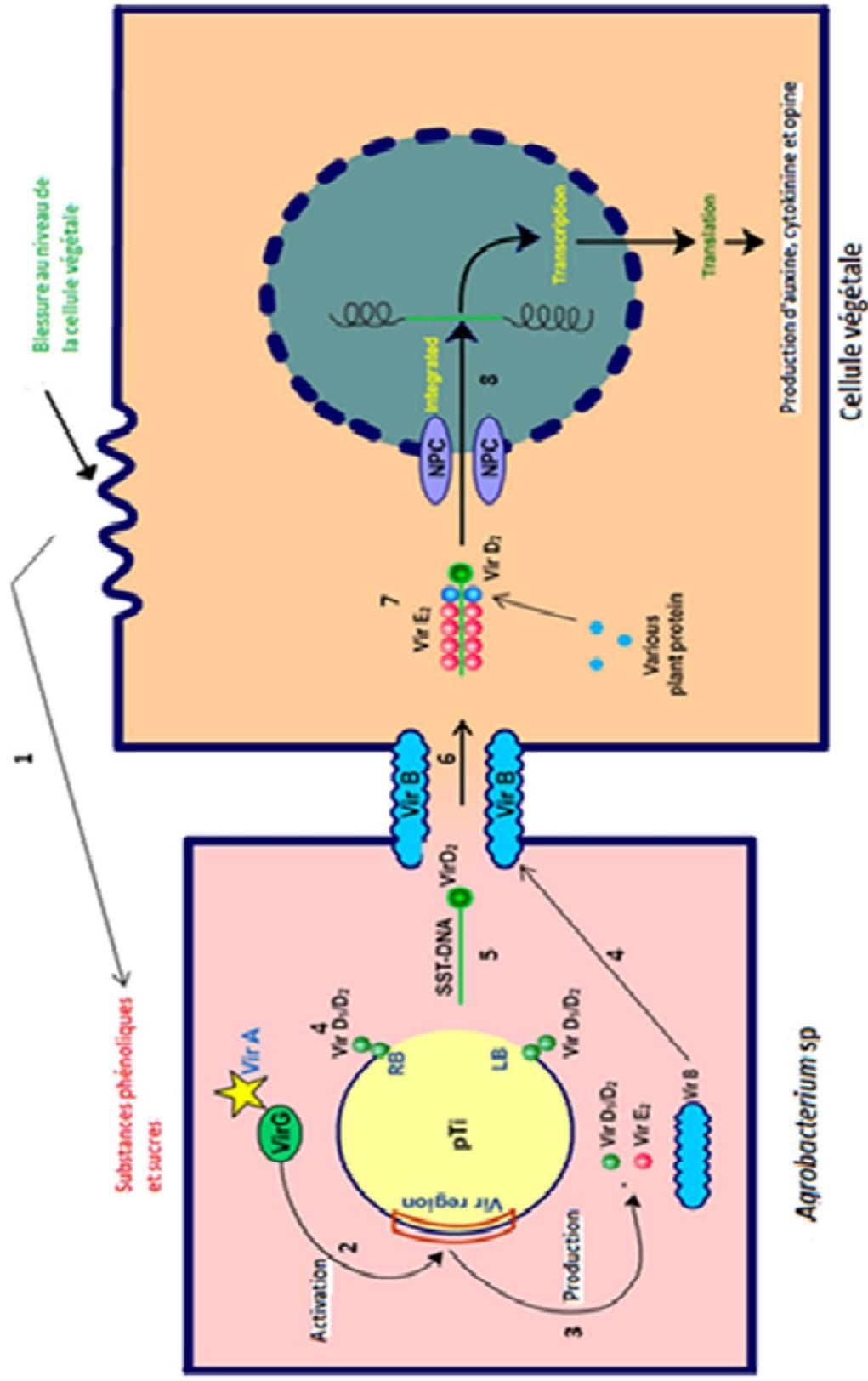


Figure 3. Mécanismes moléculaires du transfert de l'ADN-T (Anonyme)

### **1.3. Production des chevelus racinaires par voie biotechnologique.**

#### **1.3.1. Avantages et intérêt des chevelus racinaires.**

*a- Propriétés de croissance* : les CRs sont ramifiés et très denses, génétiquement plus stable dans le temps et doués d'une croissance plaigiotropique et rapide comparée aux racines naturelles (Giri et Narasu, 2000 ; Kim *et al.*, 2002 ; Souret *et al.*, 2003 ; Lanoue *et al.*, 2004 ; Woo *et al.*, 2004 ; Zhi-Bi et Min, 2006). De plus, les CRs croissent rapidement sur un milieu de culture dépourvu de régulateurs de croissance (David *et al.*, 1984 ; Tepfer, 1984 ; Capone *et al.*, 1989).

*b- Propriétés biochimiques* : Les CRs induits par transformation génétique donnent généralement des rendements accrus en métabolites secondaires (Giri et Narasu, 2000 ; Kovalenko et Maliuta, 2003). Aussi, ils peuvent produire de nouveaux composés qui ne sont pas naturellement synthétisés par des racines non transformées (Zhi-Bi et Min, 2006).

#### **1.3.2. Facteurs influençant l'induction des chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes*.**

*a- Effet de la souche et de la concentration bactérienne* : la réponse de la plante à la transformation génétique dépend de la souche bactérienne utilisée (Ercan et Taskin, 1999). La concentration bactérienne joue un rôle très important dans l'efficacité d'induction des CRs chez les plantes. Une faible concentration se traduit par une faible disponibilité des bactéries pour la transformation alors qu'une forte concentration diminue l'efficacité de la transformation à cause de l'inhibition compétitive entre les bactéries (Kumar *et al.*, 1991 *in* Tao et Li, 2006). En général, la meilleure concentration bactérienne se situe au niveau d'une DO (600 nm) = 0,5 (Dhakulkar *et al.*, 2005).

*b- Effet du génotype et de l'âge du tissu* : le succès de la transformation dépend de différents paramètres tels que le génotype et l'âge du tissu. En général, les jeunes

plantes sont plus sensibles à une infection bactérienne (Sevon et Oksman-Caldentey, 2002).

**c- Effet de la température** : les gènes *vir* des souches d'*Agrobacterium* ne s'expriment pas à des températures supérieures à 32°C (Jin *et al.*, 1997).

**d- Effet du pH** : le pH acide (pH 5,7) induit en général plus de virulence (Mantis et Winans, 1992 ; Li *et al.*, 2002 ; Lièvre, 2004 ; Gao et Lynn, 2005).

**e- Effet des composés phénoliques** : Des composés phénoliques activateurs de la virulence comme l'acétosyringone qui, ajoutés au milieu de suspension bactérienne, améliorent l'induction des CRs (Hu *et al.*, 1993 *in* Giri et Narasu, 2000 ; Tao et Li, 2006 ; Sahli et Gadiri, 2015).

**f- Effet des monosaccharides** : le fructose, le galactose, le glucose et le xylose activent les gènes *vir*. Parfois leur apport est nécessaire pour transformer certaines plantes (Ankenbauer et Nester, 1990). Cet effet est accentué en présence d'acétosyringone (Cangelosi *et al.* 1990 ; Wise *et al.*, 2005, Sahli et Gadiri, 2015 ).

### **1.3.3. Protocoles de production des chevelus racinaires.**

La production des CRs se déroule en trois étapes (Tikhomroff, 2002 ; Amdoun *et al.* 2005) :

- a- Culture et activation de la bactérie *A. rhizogenes*,
- b- Infection et co-culture plante bactérie,
- c- Isolement des CRs.

#### **a- Culture et activation de la bactérie.**

Différents milieux de base pour l'entretien des bactéries sont utilisés tels que le milieu gélosé YEB (Yeast Extract Broth) ou LGPA (Ayadi et Trémouillaux-Guiller, 2003). Pour Giri *et al.* (2001) et Dhakulkar *et al.* (2005) l'entretien des bactéries se fait sur l'Agar nutritif. L'incubation des bactéries se fait à  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 16 à 30 heures avant de préparer les suspensions bactériennes (Kovelenko et Maliuta, 2003 ; Dhakulkar *et al.* 2005).

### ***b- Infection et co-culture plante-bactéries.***

Avant l'infection, la bactérie activée est mise en suspension dans un milieu de culture tel que le YEM liquide (Amdoun *et al.*, 2008) ou LGPA liquide (Ayadi et Trémouillaux-Guiller, 2003). En général, la suractivation des gènes *vir* est obtenue en ajoutant l'acétosyringone au milieu de suspension de la bactérie (Kovelenko et Maliuta, 2003) ou au milieu de co-culture (Giri *et al.* 2001 ; Tao et Li, 2006).

Différents protocoles d'infection sont utilisés pour la transformation génétique :

- Infection par dépôt : L'infection se fait par simple dépôt à l'aide d'une aiguille au niveau de la section basale des fragments d'hypocotyles qui sont ensuite déposés sur le milieu MS. La co-culture bactérie-plante se fait à l'obscurité à  $26 \pm 1$  °C. Le repiquage des hypocotyles infectés sur milieu frais contenant un antibiotique est nécessaire jusqu'à l'apparition des racines transformées (Amdoun *et al.*, 2006).
- Infection par immersion : les explants sont immergés dans la suspension bactérienne pendant 20 minutes. Après infection, les explants sont transférés sur milieu MS pour la co-culture. Après 48 heures, ces derniers sont transférés sur milieu MS contenant de la céfotaxime pour éliminer les bactéries (Giri *et al.*, 2001).

### ***c- Isolement et culture des chevelus racinaires.***

Lorsque les racines apparaissent sur le site d'infection et atteignent 1 cm ou plus, elles sont excisées et placées sur milieu de culture solide (Vallet, 1996). Selon Dhakulkar *et al.* (2005), les racines néoformées sont séparées de l'explant lorsqu'elles atteignent 4 à 5 cm de longueur, puis placées sur milieu MS gélosé.

### 1.3.4. Confirmation de la transformation génétique.

Afin de vérifier que les racines isolées sont des CRs, trois méthodes peuvent être utilisées :

- Méthodes phénotypiques : La vérification de la transformation génétique peut être faite par des critères phénotypiques telles que : La croissance plaigiotrope (Giri et Narasu, 2000 ; Kovelenco et Maliuta, 2003), la vitesse de croissance qui est plus importante que celle des racines normales cultivées dans les même conditions (Tepfer, 1982 ; Guillon *et al.*, 2006) et une importante ramification latérale (Flores et Medina-Bolivar, 1995 ; Woo *et al.*, 2004) aussi une autotrophie aux régulateurs de croissance
- Méthode biochimique : Giri *et al.* (2001) et Kovalenko et maliuta (2003) ont confirmé le caractère transgénique des CRs par une analyse des opines. En effet, la synthèse des opines ne s'exprime que dans les cellules végétales transformées (Lambert *et al.*, 1988).
- Méthode moléculaire : permet de déterminer le nombre de copies des transgènes et les éventuels réarrangements par hybridation Southern et met en évidence la présence d'un fragment de taille correcte par amplification PCR (White, 1996 ; Tao et Li, 2006) ainsi que la stable intégration des gènes *rol* dans les cellules transformées peut être confirmée par analyse PCR en utilisant les amorces correspondantes à des séquences des gènes *rolA*, *rolB* et *rolC* à savoir :

A<sub>1</sub>(s): CAGAATGGAATTAGCCGGAC

*RolA*:

A<sub>2</sub> (as): TTAATCCCGTAGGTTTGTTC

B<sub>1</sub> (s): ATGGATCCCAAATTGCTATTCC

*RolB*:

B<sub>2</sub> (as): GTTTACTGCAGCAGGCTTCATG

C<sub>1</sub> (s) : ATGGCTGAAGACGACCTGTGT

*RloC* :

C<sub>2</sub> (as) : GCCGATTGCAAACCTTGCACTC

De fait, des amplifications de 307 pb (*rolA*), 762 pb (*rolB*) et 539 pb (*rolC*) sont observées à partir des extraits d'ADN génomique (Ayadi et Trémouillaux-Guiller, 2003).

## 2.1. Matériel et Méthodes

Le travail expérimental est réalisé à l'Institut National de Recherche Forestière (INRF) Bainem à Alger au niveau du Laboratoire des cultures *in vitro* et du Laboratoire des interactions Plante-Microorganisme durant cinq mois (Février-Juin).

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets simples et d'interactions de deux facteurs influençant l'induction de CRs chez *Z. album* L. infectée par la souche sauvage *A<sub>4</sub>* d'*Agraobacterium rhizogenes*. Il s'agit du saccharose et du pH du milieu de culture de la suspension bactérienne.

Afin d'étudier l'induction des CRs chez *Z. album*, deux réponses sont mesurées :

- Le pourcentage de réactivité ( $Y_{Réac.}$ ) : c'est le nombre de plantules ayant formé un cal au niveau du site d'infection.
- Le rendement des CRs induits ( $Y_{Rdt}$ ) : c'est le nombre total de racines obtenues par traitement.

Ce travail porte aussi sur la caractérisation biochimique (contenu en alcaloïdes totaux) des CRs obtenus par Sahli et Gadiri (2015).

### 2.1.1. Matériels.

#### A. Matériel biologique

##### A.1. Matériel végétal :

- **Graines de *Z. album*.**

Les graines de *Z. album* sont récoltées à maturité au mois d'Avril 2014 dans l'Ahaggar (Sahara central en Algérie).

➤ **Vitrosemis.**

Sont obtenues après la mise à germination des graines de *Zygophyllum album*. réalisé sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962).

➤ **Lignées racinaires Callogènes et performantes de *Z. album* :** obtenues par Sahli et Gadiri en 2015.

## **A.2. Souche bactérienne A<sub>4</sub>**

La souche sauvage A<sub>4</sub> utilisée est originaire de Californie (Etats-Unis). Elle a été isolée par Dubrin (Bouzar, 1983). C'est une souche à agropine qui porte le plasmide *Ri* dont l'ADN-T est constitué de deux régions, le T<sub>L</sub>-DNA et le T<sub>R</sub>-DNA séparées par une région non transférée. Le T<sub>L</sub>-DNA (left DNA) comporte 4 locis : *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, responsables de la morphologie des racines transformées. Le T<sub>R</sub>-DNA (right DNA) porte les gènes responsables de la production d'auxine et de cytokinine ainsi que les gènes ops qui sont responsables de la production d'opines (Lambert *et al.*, 1988 ; Tao et Li, 2006).

## **B. Matériel non biologique**

- **Verrerie stérile :** Erlenmeyer, Béchers, tubes à essai, Flacons, pipettes graduées (10-20 ml), pipette pasteur.
- **Milieux de culture :** Milieu YEM, milieu MS.
- **Réactifs :** HCl (0,1 N), NH<sub>4</sub>OH, CHCl<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre
- **Equipements :** Microscope photonique, Autoclave, Etuves (220° C, 27° C)  
Balance électronique, agitateur magnétique, distillateur, Hotte à flux laminaire.
- **Autres :** Chambre de culture, Spatules, Barreaux magnétiques, Pincettes stériles, parafilm, boîtes de pétri, Papier filtre stérile, Micro-seringues, Micropipettes, Embouts, ciseau stérile.

### 2.1.2. Méthodes

**a. Echantillonnage.** Les graines sont mises à germer par ensemencement dans 220 boîtes de Pétri contenant le milieu MS à raison de 5 graines par boîte, dans le but de réaliser 11 traitements et 20 répétitions pour chaque traitement.

Les boîtes de Pétri sont mises dans une chambre de culture à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  et une photopériode de 16 heures de lumière/ 8 heures d'obscurité.

Pour la caractérisation biochimique, la détermination de la teneur en alcaloïdes totaux est mesurée par pesée à savoir : 3 répétitions pour chaque extrait.

#### **b. préparation des milieux de culture.**

➤ **Milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) :** Est composé de Macro et Micro-éléments et de Vitamines (Tableau1).

Ce milieu est supplémenté de 7 g/l d'agar, de 20 g/l de saccharose et de 0,25 g/l de Céfotaxime (antibiotique) pour éviter la prolifération de la bactérie (Amdoun, 2010). Le pH du milieu est ajusté à 5,8.

**Tableau 1.** Composition du milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962).

	<b>Composition chimique</b>	<b>Concentration (mg/l)</b>
<b>Macroéléments</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	440
	MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>Micro-éléments</b>	KI	0,83
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	16,9
	ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	8,6
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,25
	CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0,025
	CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,025
	Fer FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	27,8
	Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
<b>Vitamines</b>	Inositol	100
	Acide Nicotinique	0,5
	Pyridoxine HCl	0,5
	Thiamine HCl	0,1
	Glycine	2

**Milieu YEM** (Vincent, 1970): Est un milieu d'isolement et d'entretien des bactéries en biologie végétale (Tableau 2). Ce milieu est supplémenté de 15 g d'Agar et ajusté à pH 7.

**Tableau 2.** Composition du milieu YEM (Vincent, 1970).

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

### c. Désinfection des graines de *Zygophyllum album*.

La désinfection des graines se fait dans l'éthanol à 96° pendant 20 secondes puis dans l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 minutes suivi de trois rinçages avec de l'eau distillée stérilisée et enfin un séchage sur papier filtre.

### d. Activation de la souche bactérienne A<sub>4</sub> d'*A. rhizogenes*

La souche bactérienne A<sub>4</sub> est conservée à - 4°C sur un milieu YEM de pH 7 supplémenté de 15 g/l d'Agar. L'activation de la souche A<sub>4</sub> est réalisée par ensemencement de cette souche dans des boites de Pétri contenant un milieu YEM gélosé. Les boites sont mises dans un incubateur à une température de 26 ± 1°C pendant 48 heures (Figure 4).

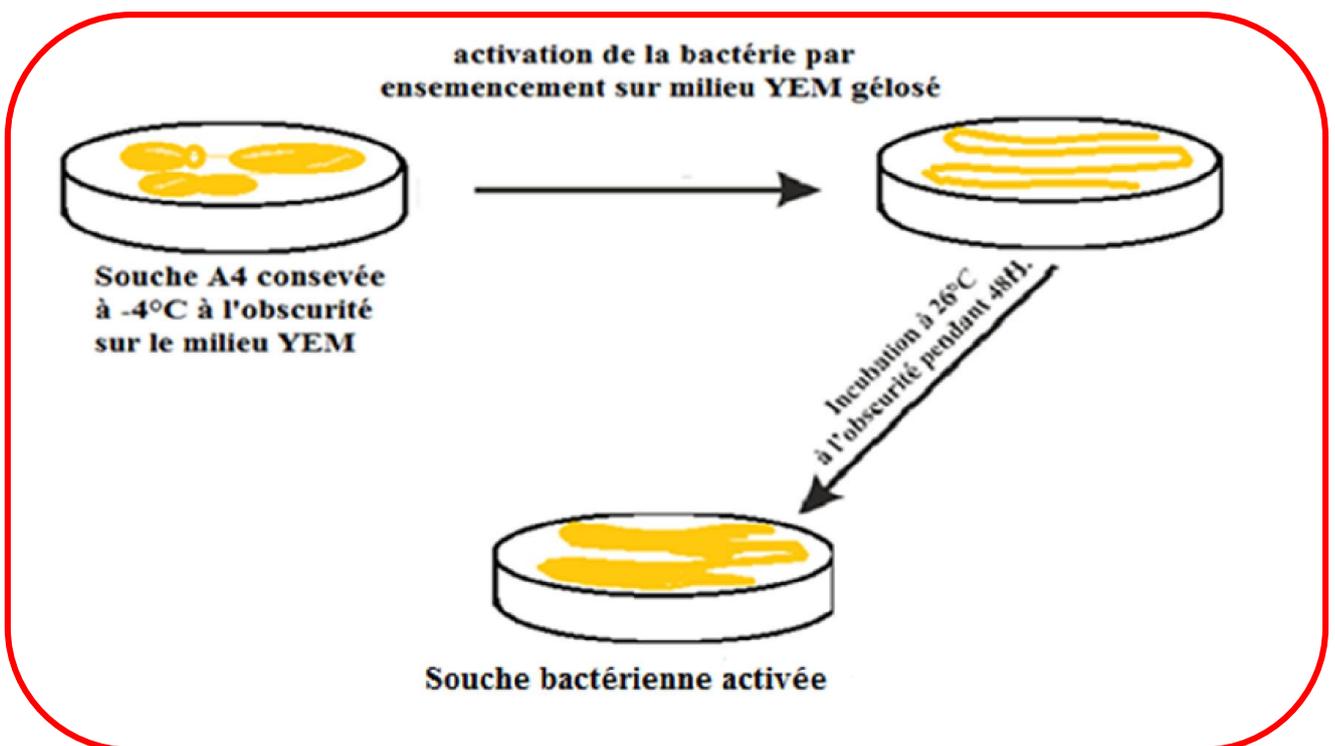
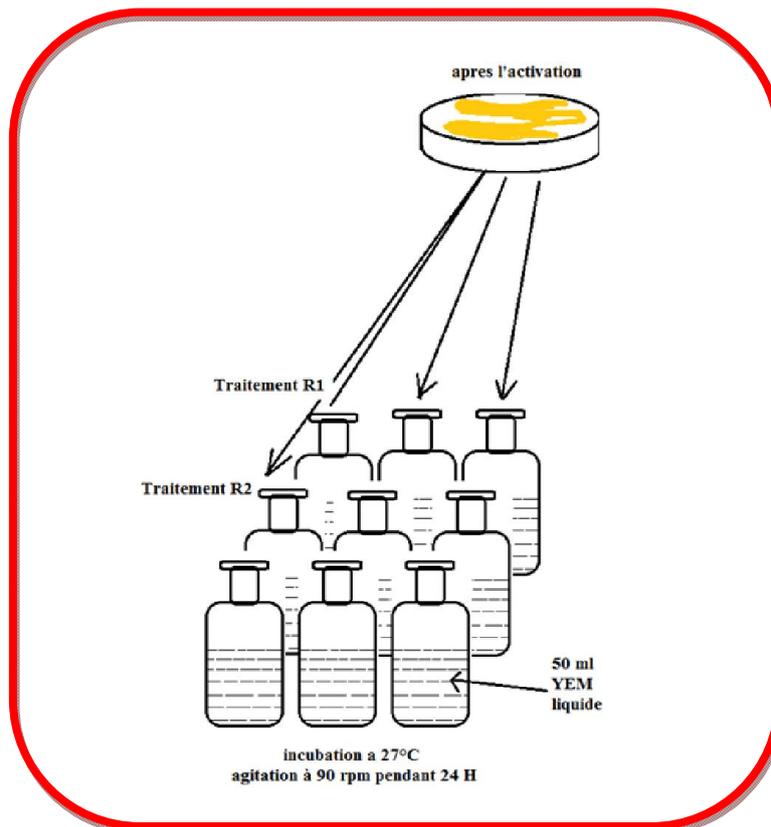


Figure 4. Activation de la souche A<sub>4</sub>.

### e. Suractivation des gènes *vir* : étude de l'effet du saccharose et du pH.

Après 48 d'incubation et d'après les différents traitements (Voir Tableau 3, P : 27), la souche A<sub>4</sub> est mise en suspension dans 50 ml de milieu YEM liquide. Les suspensions bactériennes sont mises en agitation (90 rpm) pendant 24 heures à une température de 27 ±1°C (Figure 5).



**Figure 5.** Protocole de préparation des suspensions bactériennes.

Afin de suractiver les gènes *vir*, les effets du saccharose et du pH de la suspension bactérienne sont étudiés. Ces deux facteurs présentent la propriété d'activer les gènes *vir* des souches d'*Agrobacterium* (Stachel et Zambryski, 1986; Davet, 1996 ; Giri et Narasus, 2000).

Pour induire les CRs, 11 expériences de différentes combinaisons à savoir : une souche bactérienne x 5 niveaux (concentrations) de saccharose x 5 niveaux de pH sont réalisées selon le plan d'expérience *Central Composit Design* (Voir Tableau 3).

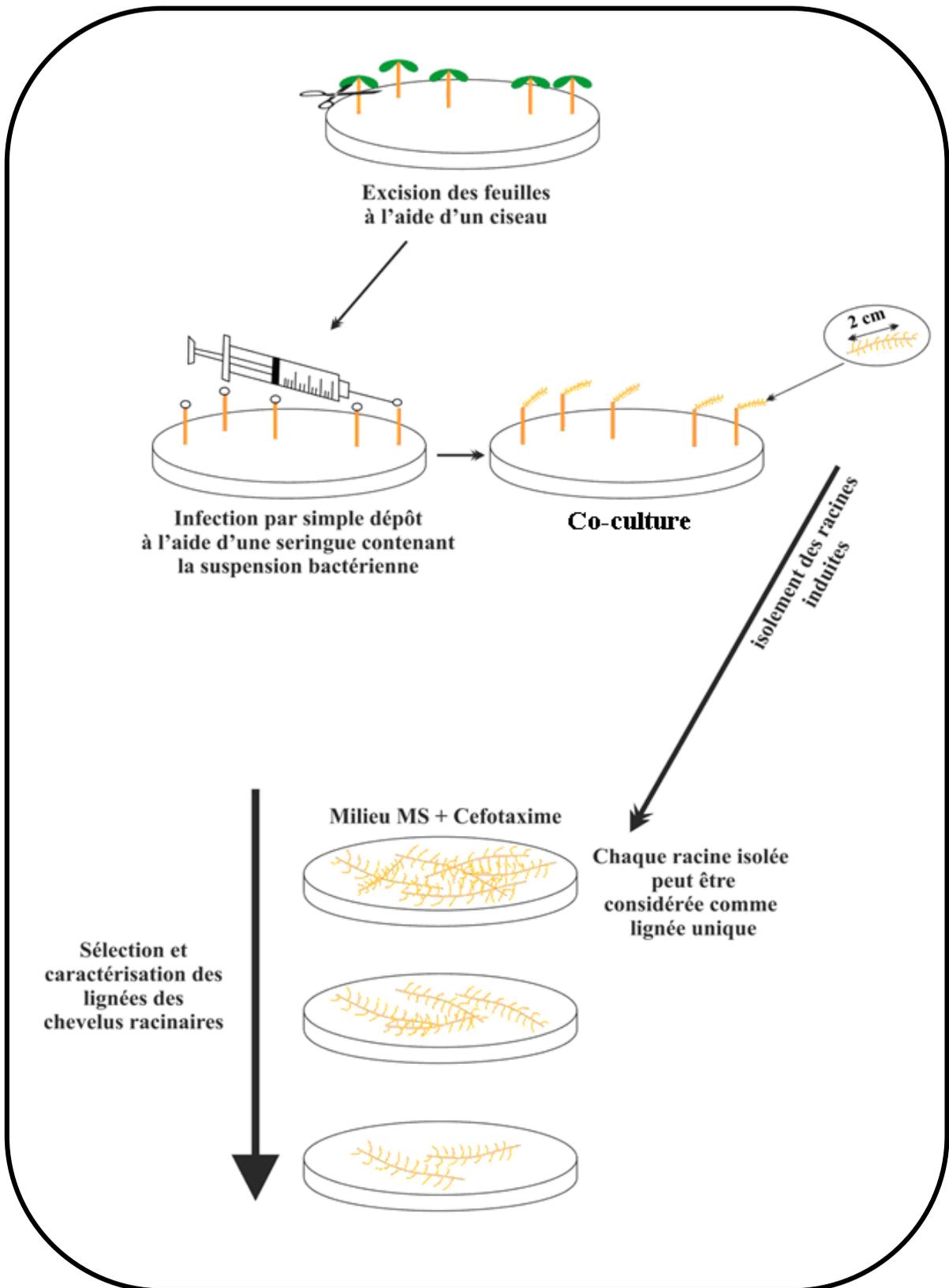
Les concentrations (niveaux) du saccharose sont : 6,95 – 18 - 26,5 - 35 et 46,05 g/l. Pour le pH, les différents niveaux sont : 3,7 - 5 - 6 - 7 et 8,30.

#### **f. Co-culture bactérie-plante et Isolement des racines induites.**

L'infection se fait par dépôt à l'aide d'une seringue contenant la suspension bactérienne (0.5 à DO= 600 nm) au niveau des hypocotyles (Figure 6).

Les vitro-plants âgés de 8 semaines et d'une longueur de 4 à 5 mm sont infectés au niveau de la tige (hypocotyle) qui a été coupée par un ciseau stérile afin de provoquer une blessure. La co-culture est réalisée à l'obscurité, à une température de  $26 \pm 1$  °C jusqu'à apparition du cal.

L'isolement des racines néoformées est réalisé lorsqu'elles atteignent 2 cm de longueur (Figure 6). Elles sont repiquées sur un milieu MS gélosé, dépourvu de régulateurs de croissance et contenant 0,25 g/l de céfotaxime pour éliminer la prolifération bactérienne. Chaque racine isolée est considérée comme lignée unique (Tikhomiroff, 2002).



**Figure 6.** Méthode de l'infection, de la co-culture et de l'isolement des racines induites.

## g. Plan d'expérience et Modélisation mathématique

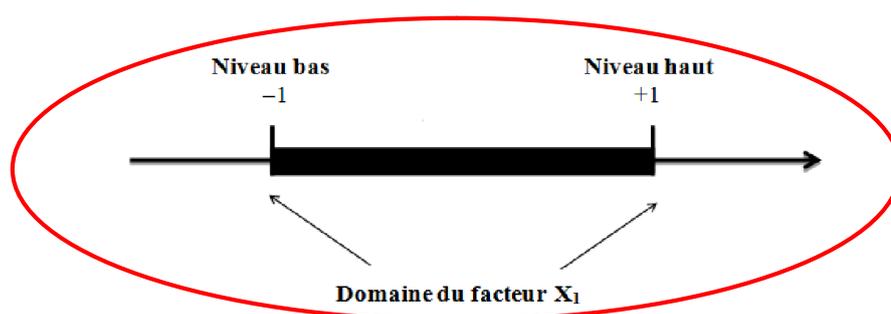
La méthode des plans d'expériences utilisée dans cette étude permet d'obtenir le maximum de renseignement avec le minimum d'essais et offre une meilleure organisation des essais expérimentaux lorsqu'on recherche une approximation d'une fonction de type équation 1 (Goupy, 2001 ; Box *et al.*, 2005) :

$$Y = f(X_i) \quad (\text{Équation 1})$$

Où  $Y$  est la réponse ( $Y_{Réac.}$  et  $Y_{Rdt}$ ) et  $X_i$  sont les variables ou les facteurs étudiés (saccharose et pH dans notre cas).

Deux notions essentielles sont associées à la méthode des plans d'expérience : celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des réponses en fonction des facteurs étudiés (Goupy, 2006).

- **Espace expérimental** : Dans notre étude, on vise à modéliser l'induction de CRs (exprimée par 2 réponses) en fonction des variations du saccharose (facteur 1, noté  $X_1$ ) et du pH (facteur 2, noté  $X_2$ ). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau qui varie entre deux bornes : La borne inférieure (niveau bas) est notée  $-1$  ; La borne supérieure (niveau haut) est notée  $+1$  (Goupy, 2001) (Figure 7).



**Figure 7.** Exemple de domaine de variation du facteur 1 ( $X_1$ ) : Saccharose.

Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre les niveaux  $-1$  et  $+1$  (Goupy, 2001 ; Goupy, 2006). Le deuxième facteur (pH) est représenté, lui aussi, par un axe gradué est orienté. Il est disposé

perpendiculairement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace appelé l'espace expérimental.

Les 5 niveaux du saccharose ( $X_1$ ) et les 5 niveaux du pH ( $X_2$ ) peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental. Ce point correspond à une expérience, l'ensemble de points expérimentaux constitue le plan d'expérience (Goupy, 2006).

- **Modélisation mathématique** : Pour les modèles mathématiques ( $Y_{Réac}$  et  $Y_{Rdt}$ ) qui relie l'induction des CRs aux variations du saccharose et du pH, on ajuste les coefficients d'une équation polynomiale (équation 2) grâce à la méthode des moindres carrés (Goupy, 2006).

$$Y = a_0 + \sum_{j=1}^k a_j X_j + \sum_{j=1}^k a_{jj} X_j^2 + \sum_{j < l} \sum_{l=2}^k a_{jl} X_j X_l + \varepsilon$$

(Équation 2)

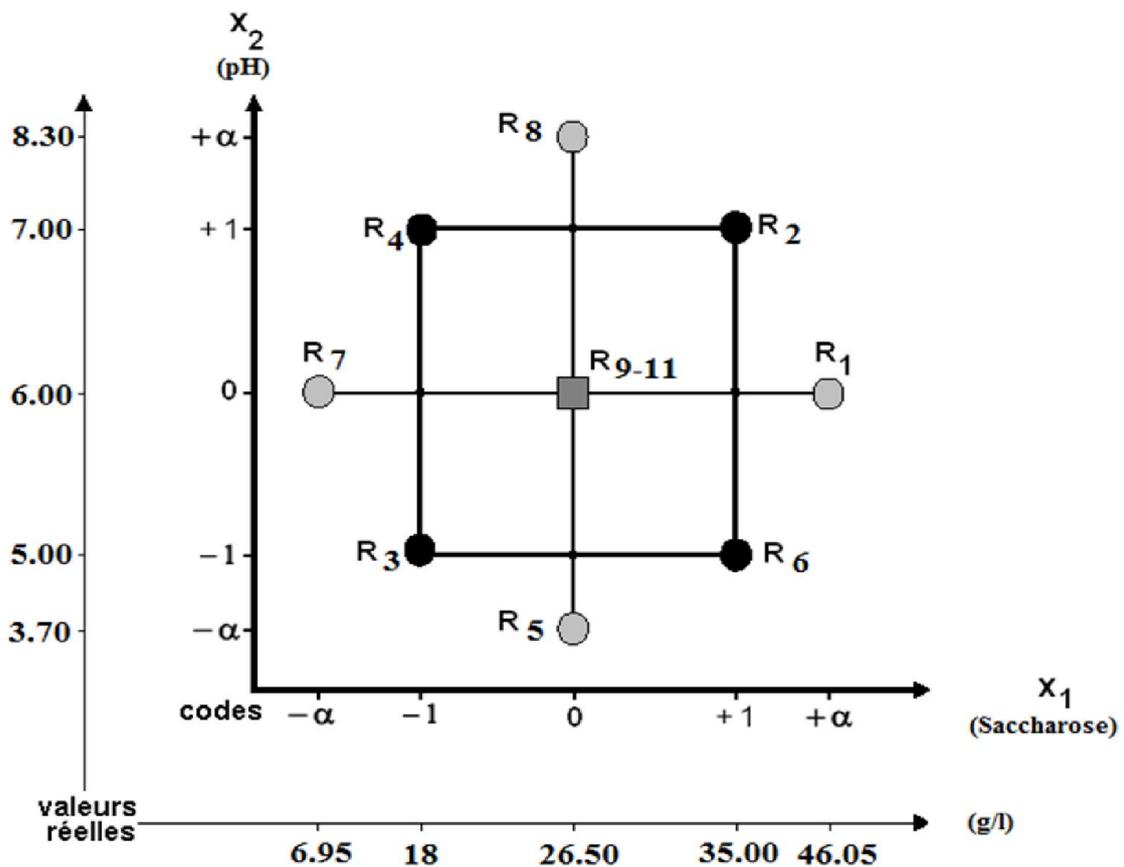
Où  $Y$  est la réponse ( $Y_{Réac}$  ;  $Y_{Rdt}$ ),  $a_0$  est l'intercepte de l'axe  $y$  ;  $a_j$ ,  $a_{jj}$  ...  $a_{jl}$  sont les différents coefficients du modèle,  $X_j$  et  $X_l$  sont les variables indépendantes (saccharose et pH) et  $\varepsilon$  est l'erreur du modèle (Goupy et Creighton, 2006). L'ajustement des coefficients de l'équation 2 se fera sur la base des données obtenues après l'application d'un plan d'expérience. Ce dernier est choisi en fonction du nombre et de la nature des facteurs étudiés, du nombre d'expérience à réaliser et les critères d'optimalité du plan en question. Selon ces critères, le plan d'expérience retenu pour notre étude est le plan composite central (*Central Composit Design*, CCD) (Tableau 3). Le CCD permet l'étude des effets simples et d'interactions du saccharose et du pH sur les réponses  $Y_{Réac}$  et  $Y_{Rdt}$ .

Cinq niveaux sont retenus pour chacun des deux facteurs considérés. Les niveaux bas et haut des facteurs sont codés respectivement  $-1$  et  $+1$  (Tableau 3). Les niveaux de la variable  $X_i$  sont codés et obtenus à l'aide de l'équation (3), où  $X_i$  est la variable indépendante en valeur codée,  $W_i$  est la variable indépendante en valeur réelle,  $W_0$  ( $W_0 = 26,5$  et  $6$  pour respectivement le saccharose et le pH) est la variable

indépendante en valeur réelle au centre et  $\Delta W_i$  est le pas ( $\Delta W_i = 8,5$  pour le saccharose et 01 pour le pH).

$$X_i = \frac{(W_i - W_0)}{\Delta W_i} \quad (\text{Équation 3})$$

Le CCD comporte trois parties : un plan factoriel  $2^k$  ( $k=2$ ), un plan en étoile ( $-\alpha = -1,147$  et  $+\alpha = 1,147$ ) et le centre du plan (Figure 8) : Chaque point (R1 à R11) correspond à une expérience. Les points R2, R3, R4 et R6 constituent le plan factoriel  $2^k$  ( $k=2$ ). Les points R1, R5, R7 et R8 constituent le plan en étoile. Les points R9 à R11 constituent les expériences effectuées au centre du domaine d'étude. Ainsi, l'application du CCD reviendrait à réaliser 11 expériences combinantes deux facteurs, dont trois expériences sont situées au centre du plan (R9–R11).



**Figure 8.** Plan d'expérience CCD et niveaux de chacun des deux facteurs ( $X_1$  : Saccharose ;  $X_2$  : pH ;  $\pm\alpha = \pm 1,147$ ).

**Tableau 3.** Différents traitements et niveaux des facteurs étudiés en valeurs codées et réelles.

<i>Expériences</i>	<i>Facteurs</i>			
	<i>valeurs codées</i>		<i>valeurs réelles</i>	
	saccharose	pH	Saccharose (g/l)	pH
<i>Traitement R1</i>	+1,147	0	46,05	6,00
<i>Traitement R2</i>	1	1	35,00	7,00
<i>Traitement R3</i>	-1	-1	18,00	5,00
<i>Traitement R4</i>	-1	1	18,00	7,00
<i>Traitement R5</i>	0	- 1,147	26,50	3,70
<i>Traitement R6</i>	1	-1	35,00	5,00
<i>Traitement R7</i>	-1,147	0	6,95	6,00
<i>Traitement R8</i>	0	1,147	26,50	8,30
<i>Traitement R9</i>	0	0	26,50	6,00
<i>Traitement R10</i>	0	0	26,50	6,00
<i>Traitement R11</i>	0	0	26,50	6,00

**Niveaux des facteurs étudiés**

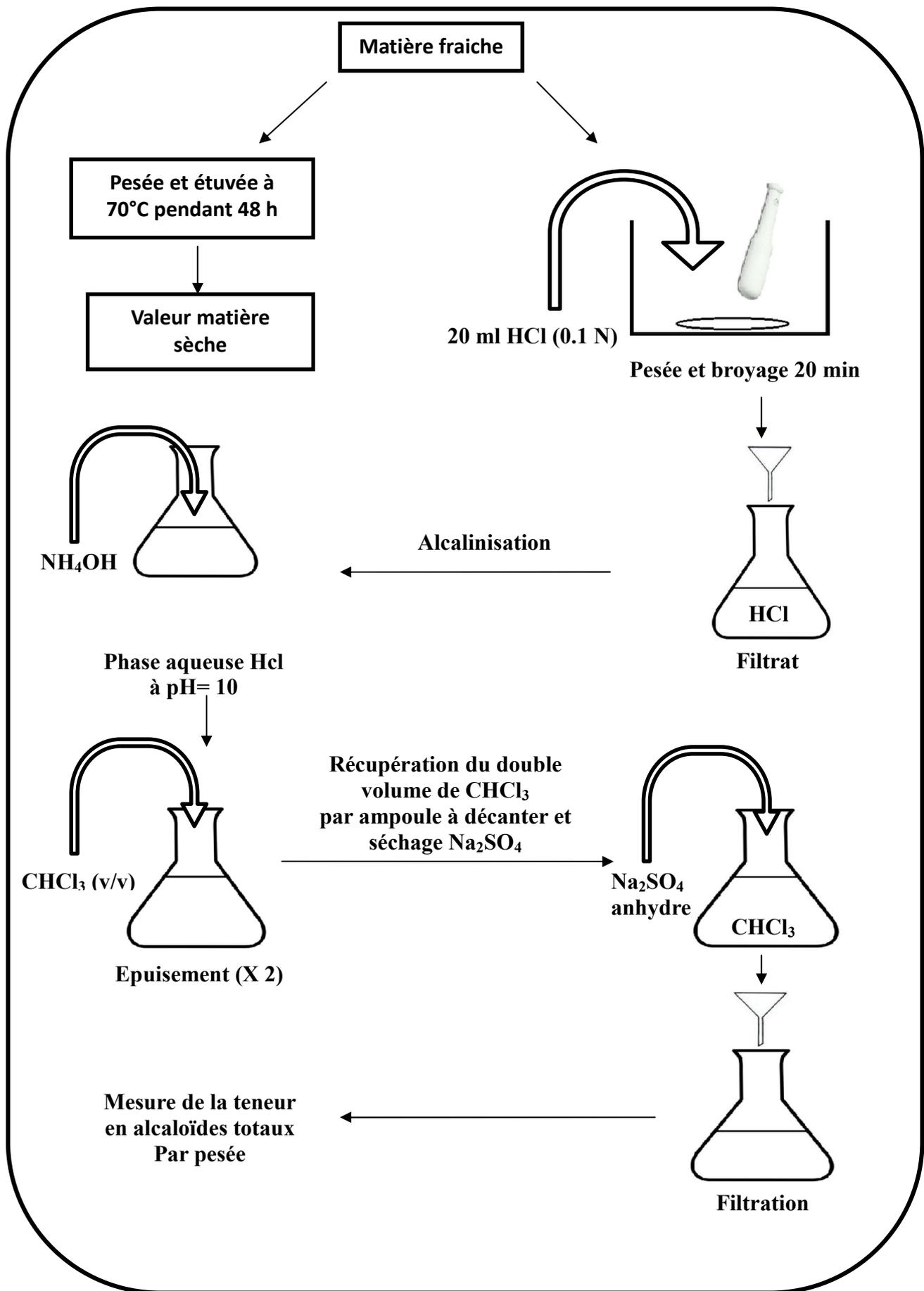
	<i>valeurs codées</i>	- 1, 147*	-1	0	+1	+ 1,147*
<b>Valeurs Réelles</b>						
Saccharose (g/l)		6,95	18,00	26,50	35,00	46,05
Ph		3,70	5,00	6,00	7,00	8,30

(\*Le critère d'optimalité retenu pour la matrice est l'orthogonalité, dans ce cas  $\pm\alpha = \pm 1, 147$ ).

## **h. Caractérisation biochimique et sélection des lignées de chevelus racinaires.**

La caractérisation biochimique (teneur en alcaloïdes totaux) est réalisée sur des CRs obtenus par Sahli et Gadiri (2015). La teneur en alcaloïdes totaux de certaines lignées sera comparée à celle de la plante de *Z. album* obtenue par vitrosemis dans des tubes à essai contenant 20 ml du milieu MS à pH 5,8. Les tubes sont mis dans une chambre de culture à une température de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  et une photopériode de 16 heures de lumière/ 8 heures d'obscurité.

L'extraction des alcaloïdes totaux est réalisée sur la matière fraîche de *Z. album* selon le principe du protocole de Amdoun et al. (2009) (Figure 9). Une partie de cette matière fraîche est mise dans l'étuve à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures pour déterminer la valeur de la matière sèche. L'autre partie est pesée puis broyée à l'aide d'un mortier avec 20 ml d'HCl (0,1N) pendant 20 minutes. Le filtrat de cette phase aqueuse (HCl) est alcalinisé avec  $\text{NH}_4\text{OH}$  jusqu'à pH 10. La solution est ensuite épuisée deux fois par  $\text{CHCl}_3$  (v/v). Un séchage du double volume de  $\text{CHCl}_3$  récupéré est effectué par du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre. Après filtration, la teneur en alcaloïdes totaux est mesurée par pesée pour chaque extrait.



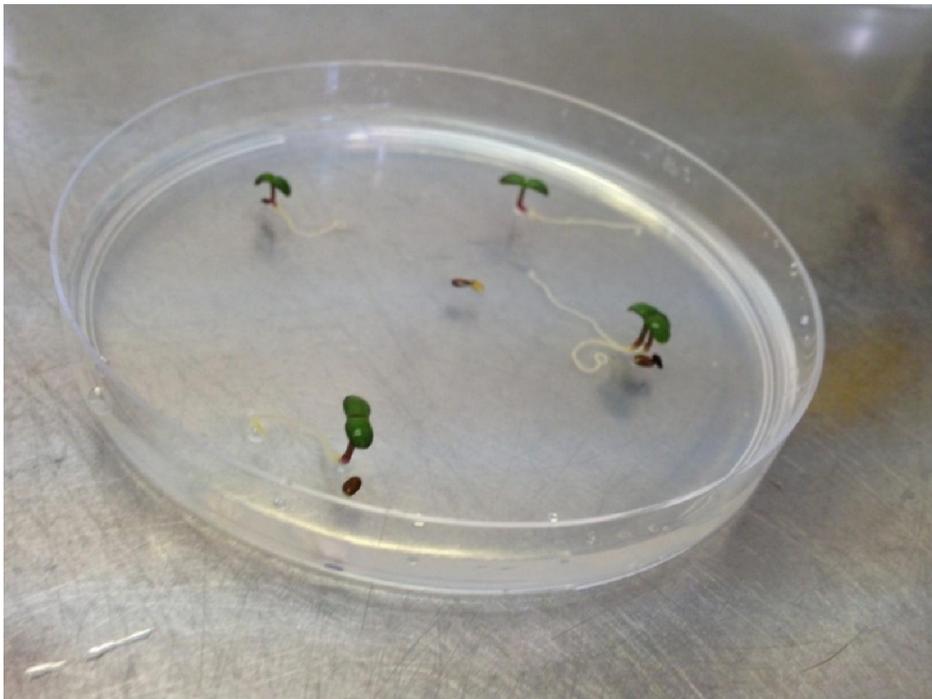
**Figure 9.** Protocole d'extraction des alcaloïdes totaux selon Amdoun *et al.*, 2009.

## 2.2. Résultats et Discussion.

### 2.2.1. Résultats

#### A. Obtention du matériel végétal destiné à l'infection

Un taux de germination de 85% a été observé après une semaine de mise à germination. Les plantules destinées à l'infection (Figure 10) sont âgées de huit semaines.



**Figure 10.** Plantules de *Z. album* âgées de huit semaines destinées à l'infection.

## B. Effets du saccharose et du pH sur l'induction des chevelus racinaires.

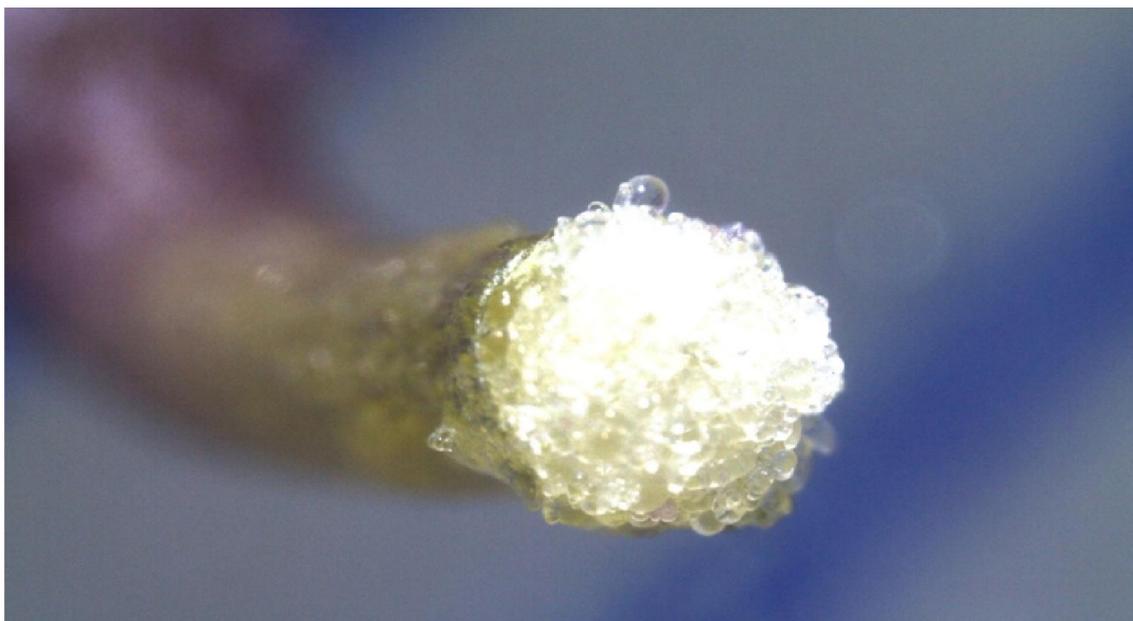
Les résultats de l'application du CCD obtenus (Tableau 4) expliquent la réaction de *Z. album* ( $Y_{Réac}$  et  $Y_{Rdt}$ ) à l'infection par la souche A<sub>4</sub>, en fonction de différentes concentrations du saccharose et du pH.

**Tableau 4.** Résultats de l'application du CCD.

Expériences	Facteurs				$Y_{Réac}(\%)$	$Y_{Rdt}(\%)$
	valeurs codées		valeurs réelles			
	Saccharose	pH	Saccharose (g/l)	pH		
<b>Traitement R1</b>	+1,147	0	46,05	6,00	73,9	53,0
<b>Traitement R2</b>	1	1	35,00	7,00	56,8	57,0
<b>Traitement R3</b>	-1	-1	18,00	5,00	58,0	21,0
<b>Traitement R4</b>	-1	1	18,00	7,00	76,4	42,0
<b>Traitement R5</b>	0	-1,147	26,50	3,70	35,1	33,0
<b>Traitement R6</b>	1	-1	35,00	5,00	71,1	47,0
<b>Traitement R7</b>	-1,147	0	6,95	6,00	46,3	31,0
<b>Traitement R8</b>	0	1,147	26,50	8,30	71,6	46,0
<b>Traitement R9</b>	0	0	26,50	6,00	93,0	39,0
<b>Traitement R10</b>	0	0	26,50	6,00	-	-
<b>Traitement R11</b>	0	0	26,50	6,00	-	-

## B.1. Le taux de réactivité ( $Y_{Réac.}$ ).

La figure 11 montre la formation de cal au niveau du site d'infection des plantules de *Zygophyllum album* 15 jours après l'infection par la souche sauvage A<sub>4</sub> d'*Agrobacterium rhizogenes*.



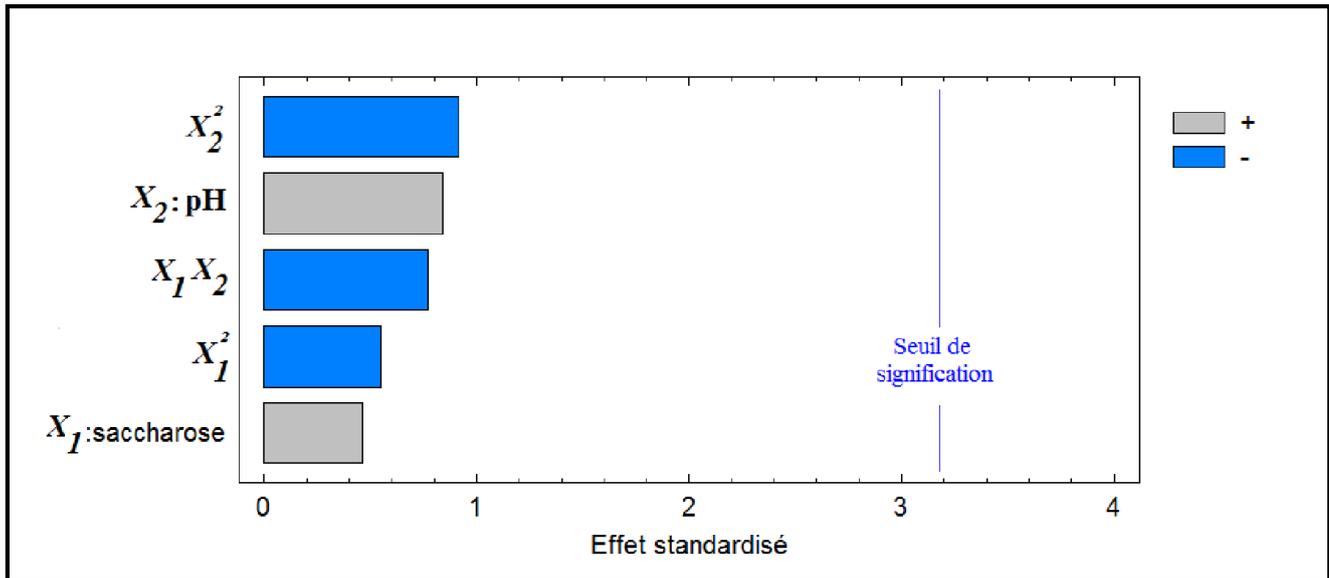
**Figure 11.** Formation de cal au niveau du site d'infection des plantules de *Z. album* après 15 jours de l'infection par la souche A<sub>4</sub> d'*A. rhizogenes*.

Le taux de réactivité varie de 35,1% à 93% (tableau 4). Le coefficient de détermination  $R^2$  du modèle mesure la variabilité expliquée par les facteurs et leurs interactions dans les réponses observées (Haaland, 1989). Le  $R^2$  du modèle  $Y_{réac}$  (équation 4) est de 0,45. Le modèle explique donc environ 45% des variations du taux de réactivité : Ce modèle n'est donc pas pertinent.

$$Y_{réac} = 79,9 + 3,8X_1 + 6,9X_2 - 7,7X_1^2 - 8,2X_1X_2 - 12,9X_2^2 \quad (\text{équation 4})$$

On observe d'après le graphique de Pareto pour le modèle  $Y_{réac}$  (Figure 12) que l'effet linéaire du saccharose et du pH semblent avoir un effet positif sur la

réactivité de *Z. album* à l'infection par la souche A<sub>4</sub>. Cependant, les effets de ces deux facteurs sont statistiquement non significatifs.

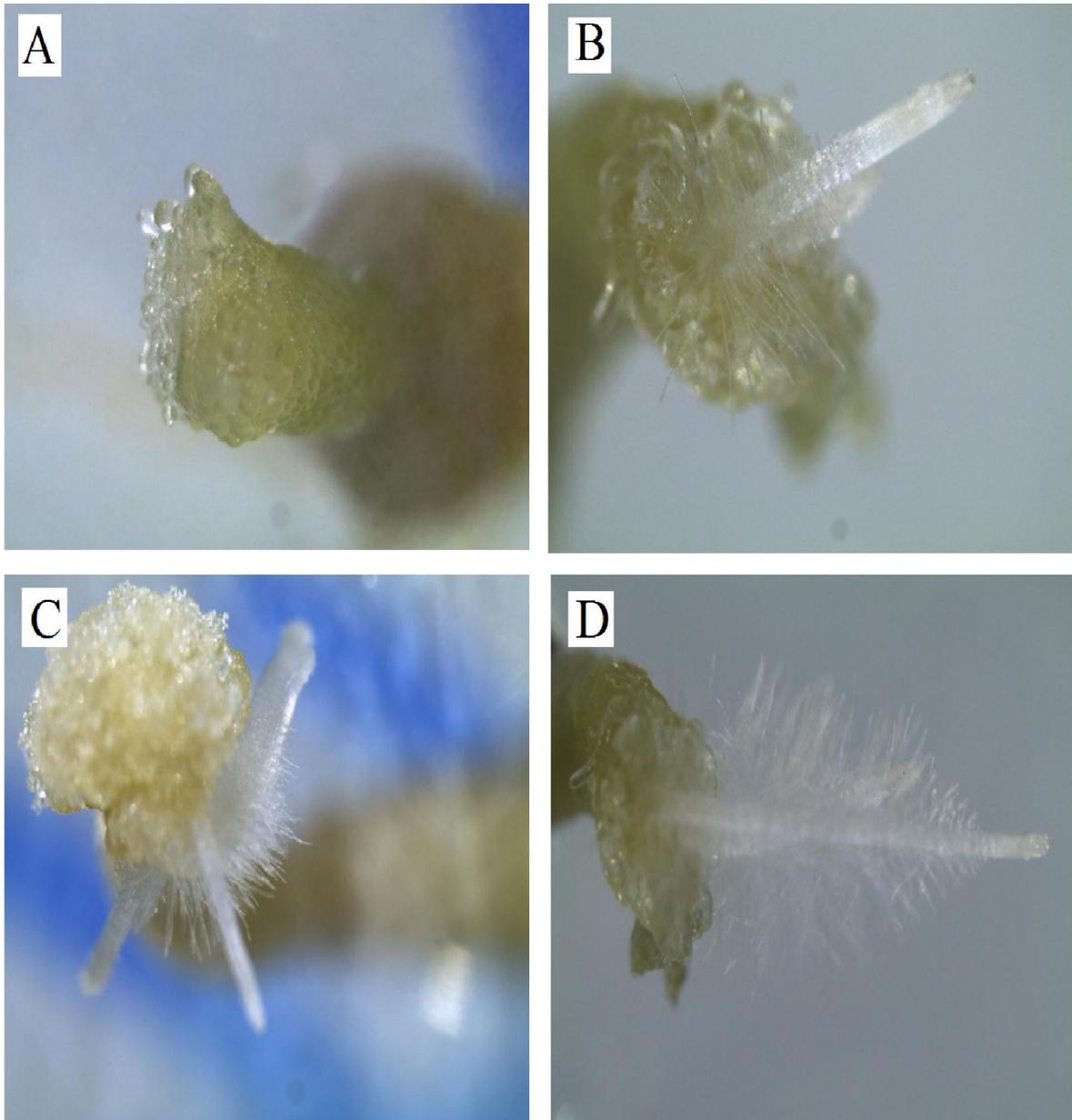


**Figure 12.** Graphique de Pareto standardisé pour  $Y_{reac}$ .

Les valeurs optimales de  $Y_{reac}$  calculées par la première dérivée du modèle (équation 4) sont 0,12 soit 27,5 g/l pour le saccharose et 0,23 soit 6,2 pour le pH ce qui permettrait d'avoir 80,9% du taux réactivité.

## B.2. Rendement des CRs induits ( $Y_{Rdt}$ ) .

La figure 13 montre la formation et la croissance des CRs au niveau du site d'infection des plantules de *Z. album* par la souche A<sub>4</sub> d'*Agrobacterium rhizogenes*.



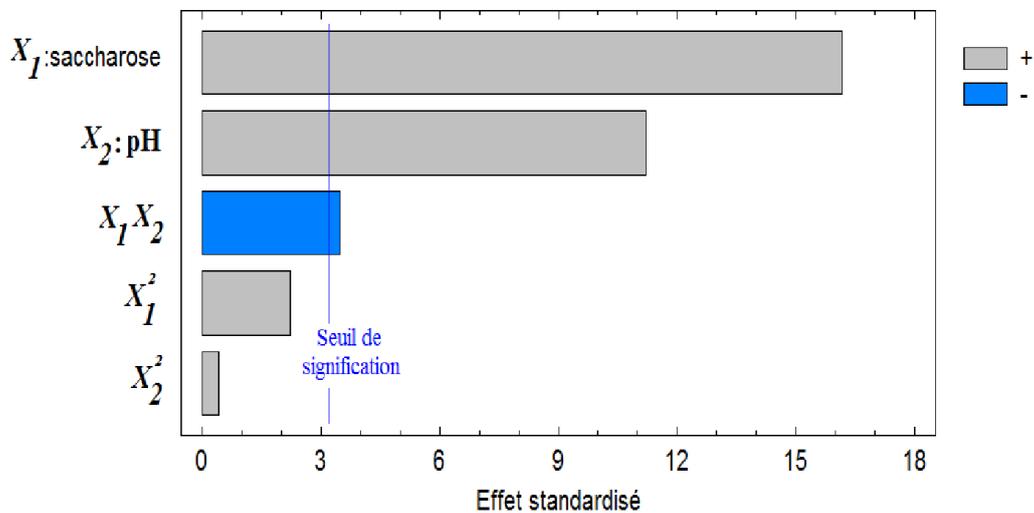
**Figure 13.** Formation et croissance des CRs au niveau du site d'infection des plantules de *Z. album* par la souche A<sub>4</sub> d'*A. rhizogenes*.

**A :** Initiation des CRs – **B :** Elongation – **C et D:** Croissance et ramification des CRs.

Le rendement des CRs varie de 21 à 57 racines induites par traitement. Le modèle  $Y_{rdt}$  (équation 4) explique 99,3% ( $R^2=0,99$ ) de la variabilité totale des résultats. Ce modèle est donc bien ajusté aux données expérimentales obtenues.

$$Y_{Rdt} = 39,0 + 10,0X_1 + 6,9X_2 + 2,3X_1^2 - 2,8X_1X_2 + 0,4X_2^2 \quad (\text{équation 4})$$

Selon le graphique de Pareto (Figure 14), le saccharose à un effet linéaire positif sur le rendement des racines induites, il est suivi par l'effet linéaire positif du pH. L'interaction des effets du saccharose et du pH est par contre négative sur le rendement des racines induites.



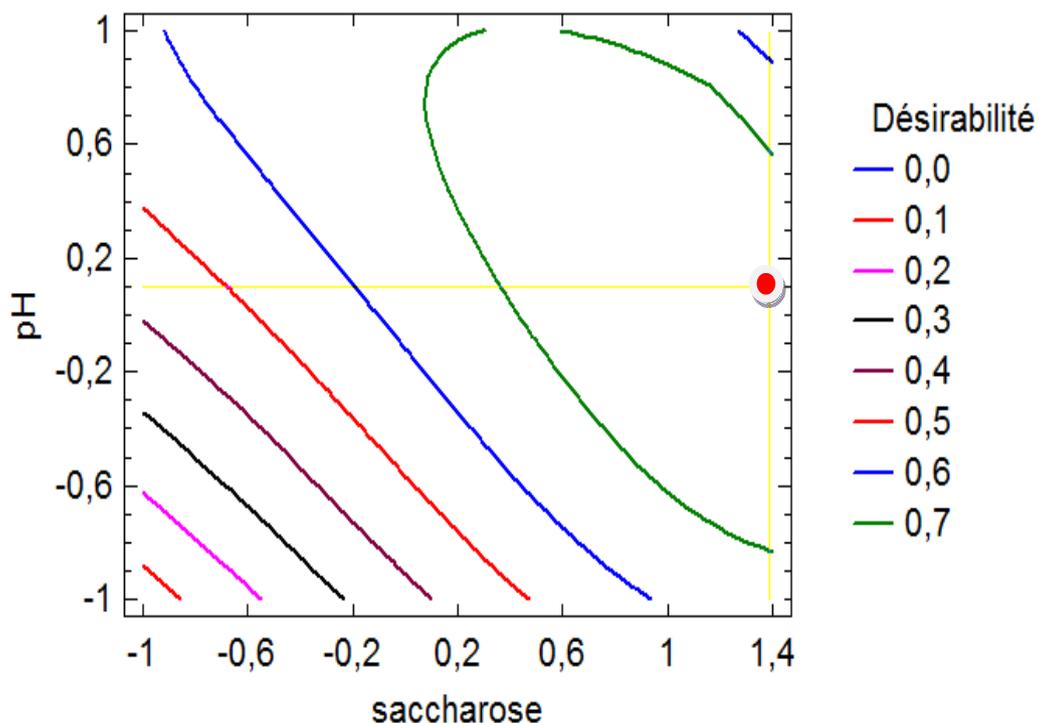
**Figure 14.** Graphique de Pareto standardisé pour  $Y_{rend}$ .

Un rendement optimal de 58,38 racines sur 100 plantules infectées peut être obtenu avec 1,15 soit 36,3 g/l pour le saccharose et 1,15 soit 7,15 pour le pH.

### B.3. Conditions optimales d'obtention de CRs.

L'optimisation simultanée de la réponse  $Y_{réac}$  et  $Y_{rend}$  est réalisée par l'application de la fonction de désirabilité  $D$  qui représente la moyenne géométrique des deux réponses modélisées. Les solutions optimales sont ceux qui maximisent  $D$  (Harrington, 1965 ; Derringer et Suich, 1980).

D'après la figure 15, les valeurs optimales en valeurs codées du saccharose et du pH qui maximisent  $D$  ( $D = 0,77$ ) sont respectivement 1,147 (36,25 g/l) et 0,08 (pH 6). Ces valeurs permettraient d'obtenir environ 74% de réactivité et un rendement de 54 racines induites sur 100 plantules infectées.



**Figure 15.** Contours d'isodésirabilité estimée de la désirabilité globale ( $D$ ) en fonction de la concentration du saccharose et du pH.

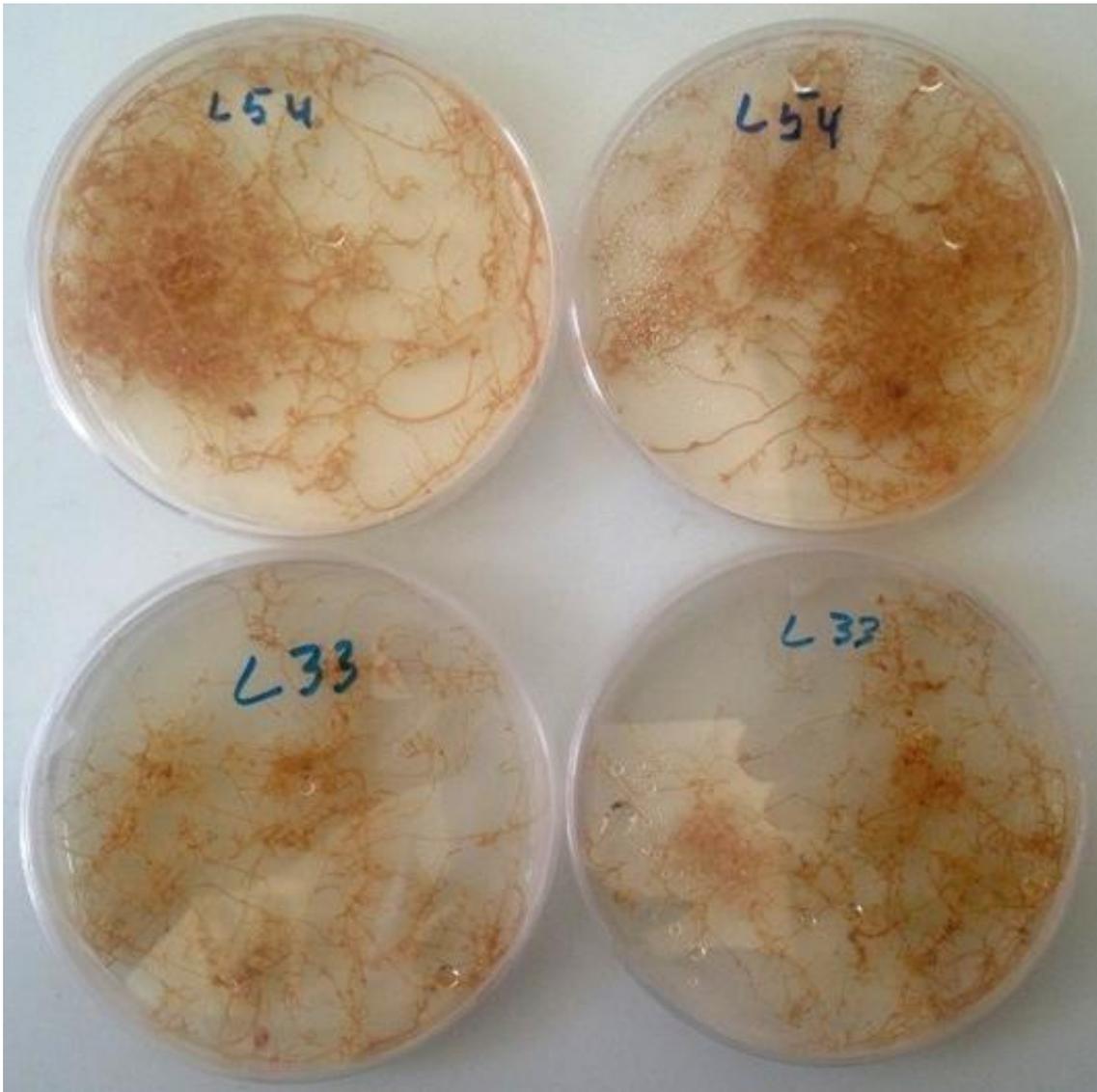
### **C. Caractérisation biochimique des lignées de CRs.**

Après isolement et mise en culture des racines induites dans le milieu MS sans régulateurs de croissance et supplémenté de 0,25 g/l de céfotaxime, certaines racines ne démarrent plus alors que d'autres se développent à une vitesse variable (Sahli et Gadiri, 2015).

La sélection des lignées racinaires par Sahli et Gadiri (2015) est basée sur deux critères : les caractéristiques phénotypiques et la vitesse de croissance. On distingue deux groupes :

1. Le premier, regroupe des racines grêles, peu ramifiées à croissance faible ou callogènes. Les racines de ce groupe sont éliminées.
2. Le deuxième groupe comporte des racines avec des ramifications latérales abondantes, et une croissance plagiotropes plus au moins rapide (Tepfter, 1982) (Figure 16). Les racines de *Z. album* qui ne montrent pas des caractéristiques d'un chevelu racinaire décrit par Tepfter (1982) sont considérées comme racines non transformées. Le choix des lignées racinaires est limité donc a ce groupe.

Les résultats de la caractérisation biochimique (teneur en alcaloïdes totaux) de deux lignées obtenues par Sahli et Gadiri (2015) ainsi que celles de la partie racinaire et aérienne de plantules issues de vitrosemis (témoin) sont résumés dans le tableau 5.



**Figure 16.** Deux lignées de CRs sélectionnées par Sahli et Gadiri (2015).

**Tableau 5.** Teneur en alcaloïdes totaux de deux lignées de CRs.

	Alcaloïdes totaux (mg/g de MS)	
	<i>Moyenne</i>	<i>Ecart-Type</i>
<i>*Partie aérienne</i>	3,5 <sup>c</sup>	± 0,8
<i>*Partie racinaire</i> (racine naturelle : Témoin)	9,1 <sup>b</sup>	± 1,2
<i>L<sub>11-1</sub></i> (lignée callogène)	9,2 <sup>b</sup>	± 1,7
<i>L<sub>6</sub></i> (lignée performante)	16,8 <sup>a</sup>	± 0,9

## ANOVA (teneur en alcaloïdes totaux)

<i>Source de variation</i>	<i>SCE</i>	<i>Ddl</i>	<i>CM</i>	<i>Test F</i>	<i>Prob.</i>
<i>Facteur</i>	268,35	3	89,45	61,90	0,000
<i>Résiduelle</i>	11,56	8	1,445		
<i>Total (Corr.)</i>	279,91	11			

*\*plantules issues de vitrosemis.*

L'analyse de la variance des moyennes de la teneur en alcaloïdes totaux des lignées de CRs et des plantules de *Z. album* montre une différence très hautement significative entre les moyennes. Le test des étendues multiple selon la méthode de Newman et Keuls révèle 3 groupes : *a*, *b* et *c* avec un seuil de 5% (tableau 5).

Avec une teneur de 9,1±1,2 mg/g MS, la partie racinaire (groupe *b*) des plantules de *Z. album* contient environ trois fois plus d'alcaloïdes que la partie aérienne (3,5±0,8 mg/g MS ; groupe *c*). La lignée L<sub>11-1</sub> (groupe *b*), qui est une lignée callogène, présente la même teneur en alcaloïdes totaux que la partie racinaire des

plantules. Cependant la lignée L<sub>6</sub> présente presque le double de la teneur en alcaloïdes (16,8 ±0,9 mg/g MS ; groupe *a*) que la partie racinaire et la lignée L<sub>11-1</sub>.

### 2.2.2. Discussion

#### *A. Sensibilité de Z. album à l'infection par la souche bactérienne sauvage A<sub>4</sub>.*

Le génotype (espèce) est un facteur déterminant pour la réussite de la transformation génétique. Les plantes dites récalcitrantes peuvent être transformées en suractivant les gènes *vir* de la bactérie par des signaux chimiques tel que l'acétosyringone ou bien par la culture de l'*Agrobacterium* dans un milieu ayant contenu des tissus blessés de la plante destinée à l'infection (Tao et Li, 2006).

Certains génotypes sont sensibles et ne nécessitent pas la suractivation des gènes *vir* de l'*A. rhizogenes* pour qu'ils réagissent à l'infection. En effet, la transformation d'*Opium poppy* et de *California poppy* par la souche R1000 et sans l'apport de l'acétosyringone donne un taux de réactivité de 92% et 93% respectivement (Park et Fachini, 2000). Les mêmes résultats sont obtenus par Kovalenko et Maliuta (2003) concernant le *Glycyrrhiza sp*, infectés par la souche 8196. Un taux de réactivité de 90% est observé chez des explants de *Z. album* infectés par la souche A<sub>4</sub> avec un faible apport d'acétosyringone (5 µM), alors qu'une forte concentration (59 µM) inhibe la réactivité (64%) des CRs chez cette même espèce (Sahli et Gadiri, 2015). Pour notre essai, le meilleur taux de réactivité observé est d'environ 93% (sans apport d'acétosyringone). Ces taux montrent que *Z. album* est une espèce sensible à l'infection par la souche A<sub>4</sub> car elle ne nécessite pas un apport d'acétosyringone.

Le génotype influe également sur le rendement des CRs induits. En effet, plusieurs espèces infectées par la même souche A<sub>4</sub> présentent différents rendements: il est de 98% des pour *Nicotiana* 80%, pour *Duboisia* et 34% pour *Datura metel* (Moyano et al., 1999). Amdoun et al. (2006) ont trouvé un taux d'induction de 20% pour les tiges de *Datura innoxia* et de 22% pour le *Datura stramonium*. Comme pour le taux de réactivité, l'acétosyringone améliore le taux d'induction chez les plantes dites récalcitrantes pour l'infection. Tao et Li (2006), rapportent que la concentration de l'acétosyringone affecte plutôt le rendement des CRs induits avec

un optimum à 30  $\mu\text{M}$  qui permet d'avoir un taux d'induction de 80% contre 25% pour les explants infectés avec la bactérie sans acétosyringone. Cependant, les résultats obtenus par Sahli et Gadiri (2015), montrent qu'une forte concentration de l'acétosyringone bloque l'induction des CRs chez *Z. album*. Dans notre cas, on enregistre un rendement de 57 racines pour le traitement R2 (35g/l saccharose, pH=7) et sans apport d'acétosyringone. Ce résultat confirme une fois de plus que le *Z. album* est une espèce sensible à la transformation génétique par la souche A<sub>4</sub>.

### ***B. Effet du pH sur l'obtention des CRs.***

La réussite de la transformation des plantes par l'*Agrobacterium* est liée à l'expression de gènes qui codent pour différentes fonctions favorisant l'infection. En général, ces gènes sont mieux activés dans l'environnement acide des plantes blessés (Li *et al.*, 2002). Lorsque le pH du milieu de la bactérie diminue, la transcription des gènes *vir* augmente (Mantis et Winans, 1992 ; Li *et al.*, 2002 ; Gao et Lynn, 2005). Au delà des limites d'un domaine allant du pH 4,5 à 6,5 le taux d'induction des CRs diminue (Tao et Li, 2006). En effet, sans ajout de l'acétosyringone au milieu, le taux d'induction chez le peuplier est de 82 % à pH 5,8 alors qu'il est de 2,2 % à pH 6,4 (Li et Huang, 1995). Pour notre essai, le pH a un effet significatif sur le rendement des CRs avec un optimum de 57% à pH de 7,17 (neutre). Ce résultat montre que *Z. album* ne nécessite pas de pH acide pour une meilleure transformation. Ceci pourrait confirmer que cette espèce est sensible à l'infection par la souche A<sub>4</sub> d'*A. rhizogenes*.

### ***C. Effet du saccharose sur l'obtention des CRs.***

Le saccharose se solubilise dans une phase aqueuse en deux monosaccharides : le glucose et le fructose. Les monosaccharides sont essentiels pour l'induction des CRs de certaines plantes. Ils activent les gènes de virulence de l'*Agrobacterium* synergiquement avec les composées phénoliques telle que l'acétosyringone. En

effet, les monosaccharides agissent de façon à augmenter l'induction des gènes *vir* par l'acétyrsingone ; c'est le complexe sucre-ChevE qui s'interfère avec VirA pour activer les gènes *vir* (Schimoda *et al.*, 1993).

En présence d'une concentration de 2,5µM d'acétyrsingone, l'expression de gène *virB* chez l'*Agrobacterium* est augmentée de 5 à 10 fois ainsi que l'addition du fructose, provoque une augmentation de l'induction de ces gènes de 60 à 200 fois (Cangelosi *et al.* 1990 ; Wise *et al.*, 2005). L'arabinose, le fructose, le galactose, le glucose et le xylose stimulent considérablement l'expression des gènes *vir* en présence d'acétyrsingone (Ankenbauer et Nester, 1990). Une concentration de 10 mM de glucose active efficacement les gènes *vir* (Ankenbauer et Nester, 1990).

Le glucose ajouté à la suspension bactérienne de la souche A<sub>4</sub> améliore le taux d'induction des CRs. De plus, L'interaction synergique du glucose et de l'acétyrsingone permet d'améliorer la précocité d'apparition des CRs et le rendement des racines induites chez *Z. album* (Sahli et Gadiri, 2015). Ceci concorde avec nos résultats, le saccharose (glucose + fructose) améliore le rendement des CRs induits même sans apport d'acétyrsingone. C'est le facteur qui pourrait avoir l'effet le plus important.

#### ***D. Effet de l'interaction sucre x pH sur l'obtention des CRs.***

L'interaction des *monosaccharides x pH acide* affecte fortement l'expression des gènes *vir* et améliore l'infection (Cangelosi *et al.*, 1990 ; Wise *et al.*, 2005). En effet, une concentration de 5 g/l d'arabinose dans le milieu de suspension bactérienne (YEB) ajusté à un pH de 5,2 améliore la transformation génétique du pommier par l'*Agrobacterium* (Trifonova et Atanassov, 1999).

Dans notre cas, l'interaction *saccharose x pH* semble avoir un effet négatif sur le rendement des CRs. Cependant, cet effet est 5 fois moins important que l'effet positif du saccharose. Le calcul des concentrations optimales (36,25 g/l de saccharose et pH 6) via la fonction de désirabilité a permis de trouver un compromis

entre ces facteurs antagonistes pour maximiser le taux de réactivité et le rendement des CRs induits.

### ***E. Caractérisation biochimique des lignées de CRs.***

Sur des explants de tige de quelques espèces fruitières (pommier, poirier, amandier, prunier) infectés par *A. rhizogenes*, Damiano et Monticelli (1998) observent sur l'ensemble des racines induites environ 67% de racines non transformées contre 26.2 % de racines transformées. Quelques explants ont formé au même site d'infection des racines transformées et des racines non transformées. Ces dernières sont induites par des régulateurs de croissance endogènes des explants.

Les lignées L<sub>11</sub>-1 et L<sub>6</sub> respectivement du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>ème</sup> groupe seraient des racines transformées parce qu'elles montrent toutes les caractéristiques phénotypiques d'un chevelu racinaire décrit par Tepfer (1982). Bien que la lignée L<sub>11</sub>-1 soit une racine transformée, elle ne montre pas une capacité particulière pour la biosynthèse des alcaloïdes contrairement à la lignée L<sub>6</sub>.

Les lignées obtenus à partir de *Tabacum*, de *Duboisia* et de *Datura* et qui forment des cals après leur mise en culture sont caractérisées par un faible taux d'alcaloïdes (Moyano et al., 1999). Ceci pourrait expliquer les faibles capacités biochimiques de la lignée L<sub>11</sub>-1 car c'est une lignée callogène.

Les différences morphologiques et la variation des vitesses de croissance observées entre les différentes lignées de CRs pourraient être attribuées d'une part aux différents sites d'insertion de l'ADN-T dans le génome des cellules végétales (Abhyankar *et al.*, 2005) et d'autre part au nombre de copies de l'ADN-T insérées (Furze *et al.*, 1987 in Dhakulkar *et al.*, 2005 ; Parc et Facchini, 2000).

Cependant, une caractérisation moléculaire s'impose pour conclure, d'une manière fiable que les CRs, putativement, transformées par la souche A<sub>4</sub> d'*A. rhizogenes* ont bien intégré les gènes *rol*, contenus au niveau de son ADN-T.

## Conclusion

Notre travail a visé l'obtention par biotechnologie des CRs chez *Z. album* L. induits par la souche sauvage A<sub>4</sub> d'*A. rhizogenes* en étudiant l'effet simple du saccharose et du pH du milieu bactérien ainsi que l'interaction entre les deux.

Nos résultats montrent que *Z. album* est une espèce sensible à l'infection et la transformation génétique via la souche A<sub>4</sub> et cela, sans apport d'acétylsyringone ni l'utilisation d'un pH acide connu pour donner une meilleure transformation. Cependant, nos résultats ont montré que le saccharose (35 g/l) est le facteur le plus important qui influence le rendement des CRs chez *Z. album* (57%). Afin d'optimiser le protocole d'obtention des CRs, une concentration d'environ 36 g/l, rajoutée dans la suspension bactérienne, est requise.

La productivité biochimique des lignées de CRs est liée à leur teneur en alcaloïdes totaux (g /gMS) et à leur vitesse de croissance. Ces deux critères dépendent du nombre de copies et du site d'insertion de l'ADN-T bactérien dans le génome végétal. Ces phénomènes aléatoires font qu'une sélection et une caractérisation sont toujours nécessaires afin de retenir les meilleures lignées.

*Zygophyllum album* est une espèce sensible à l'induction des CRs par la souche A<sub>4</sub> ceci constitue un avantage qui facilite son exploitation dans la production des métabolites secondaires à intérêt médicinal par voie de biotechnologie.

En revanche, vu les contraintes rencontrées durant notre travail concernant la croissance lente et la fragilité de cette espèce in vitro, il est nécessaire d'étudier son comportement in vivo afin d'optimiser son milieu de culture in vitro.

## Références bibliographiques

**Anonyme.** *Zygophyllum album* L. **A** : Fleurs et feuilles (Source [www.flickr.com/photo](http://www.flickr.com/photo)) – **B** : Fruits et feuilles (Source [www.sahara-nature.com/album](http://www.sahara-nature.com/album)).

**Anonyme.** Mécanisme moléculaire du transfert de l'ADN-T (source [www.nptel.ac.in/courses/102103016/module4/lec32/1.html](http://www.nptel.ac.in/courses/102103016/module4/lec32/1.html)).

**Abhyankar G., Reddy V.D., Giri C.C., Rao K.V., Lakshmi V.V.S., Prabhakar S., Vairamani M., Thippeswamy B.S. et Bhattacharyap.S., (2005).** Amplified fragment length polymorphism and metabolic profiles of hairy roots of *Psoralea corylifolia* L. *photochemistry*. 66 : 2441-2457.

**Amal M.Y., Moustafa A., Khodair A.I., Hamouda F.M., Husseiry A., (2007).** Phytochemical and toxicological studies of *Zygophyllum album* L. *Journal Pharmacol. Toxicol.* 2(3): 220-237. Egypt.

**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. *Doct. Sci. Agr. ENSA. El Harrach – Alger.*

**Amdoun R., Khelifi L., Amroune S., Khelifi-Slaoui M., (2005).** Production de chevelus racinaires par transformation génétique *in vitro* chez deux espèces de *Datura*. *Actes du Séminaire International sur l'amélioration des productions végétales. Alger, Ed. Khelifi :* 83-85.

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

**Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Zarouri B., Boutoumi Y., Krimi Z., (2008).** Chevelu racinaire de *Datura stramonium* L. induit par *Agrobacterium*

*rhizogenes* en vue de la production d'alcaloïdes par voie biotechnologique. Revue des technologies avancées CDTA. 10 : 39-44.

**Amdoun R., Khelifi L., Zarouri B., Slaoui M., Amroune S., (2006).** Production de chevelus racinaires chez deux espèces de *Datura* par transformation génétique in vitro. Revue Biotechnologies végétales. 00 : 7-9.

**Ankenbauer R. G., Nester E.W., (1990).** Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes : structural specificity and activities of monosaccharides. *J Bacteriol.* 172: 6442-6446.

**Ayadi R., Trémouillaux-Guiller., (2003).** Root formation from transgenic colli of Ginkgo biloba-Tree physiology 23, 713-718.

**Belguidoum M., Dendougui H., Kendour., J.,(2015).** Chem. Pharm. Res, 2015, 7(1): 510-514.

**Bellakadhar., Delaveau P., Verdrager J., (1982).** Histoire et renouveau des plantes médicinales, Paris : *Alain Michel*, p. 353.

**Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., & Fliniaux, M. A. (2000.a).** Effects of the rol C gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *Journal of natural products*, 63(9), 1249-1252.

**Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M. A., & Jacquin-Dubreuil, A. (2000.b).** Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rolA, B, C genes only. *Journal of biotechnology*, 81(2), 151-158.

**Boumaza A., (2009).** Effet de l'extrait méthanolique de *Zygophyllum cornutum* contre le stress oxydant associé au diabète sucré et les organes en relation, Université Mentouri Constantine. Mémoire magister, p. 44.

**Bouzar H., (1983).** A survey of *Agrobacterium* strains associated with Georgia Pecan trees and an immunological study of the bacterium. Thèse Master of Science. Oregon state University, p. 67.

**Box G., Hunter E.P., William G., Hunter J., (2005).** Stuart "Statistics for Experimenters" deuxième édition. John Wiley and Sons. New-York, p. 633.

- Cangelosi G.A. Ankebauer R.G. et Nester EW., 1990.** Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Genetics*. Vol.87. 6708-6712.
- Capone I., Spano L., Cardarelli M., Bellincampi D., Petit A., Costantino P., (1989).** Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Mol. Biol.* 13, 43-52.
- Cardarelli M., Spano L., Mariotti D., Mauro M.L., Van sluys M.A., Costantino P., (1987.a).** *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet*, 209: 457-480.
- Cardarelli M., Spano L., Mariotti D., Mauro M.L., Van sluys M.A., Costantino P., (1987.b).** The role of auxin in hairy root induction. *Mol. Ben. Genet*, 208: 457-463.
- Chehma A., (2006).** Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien, p. 140.
- Chopra, I. C., Abrol, B. K., Handa, K. L., Paris, R., & Dillemann, G. (1960).** Medicinal plants of the arid zones. Part 1. With particular reference to the botanical aspects. Part 2. With particular reference to the pharmacological aspects. *Arid Zone Research, UNESCO, Paris*, (13).
- Christen P., Roberts M.F., Philipson J.D., Evans W.C., (1990).** Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant cell Rep*, 9: 101-104.
- Damiano C. Et Monticelli S., 1998.** In vitro fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol.1, n°2 : 189-195.
- Davet P., (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA. Paris. 383p.
- David C., Chilton M.D., Tempé J., (1984).** Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Biotech.* 2, 73-76.
- Derringer G. and Suich R. (1980).** Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*. 12 (4): 214 – 219.
- Dessaux Y., Petit A., Tempé J., (1993).** Chemistry and biochemistry of opine, chemical mediators of parasitism, 34: 31-38.

**Dhakulkar S., Ganapathi T.R., Bhargava S., Bapat V.A., (2005).** Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy root. *Plant Science*. 169: 812-818.

**El Ghou J., Ghanem-Boughannmi N., Ben Attia M., (2011).** Biomedecine Biochemical study on the protective effect of ethanolic extract of *Zygophyllum album* on streptozotocin-induced oxidative stress and toxicity in mice and preventive Nutrition Vol. 1, Issue 2, April-JUNE 2011, 79-83.

**Ercan A.G., Taskin M., (1999).** *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. population grown in Turkey. *Tr. J. of Botany*, 23: 373-377.

**Flores H.E., Medina-Bolivar F., (1995).** Root culture and plant natural products: "unearthing" the hidden half of plant metabolism. *Plant tissue culture and biotechnology*. 1, 2: 59-74.

**Flores H.E., Vivanco J.M. et Loyola-Vagas V.M., 1999.** Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends plant sci.* 4: 220-226.

**Gao, R., & Lynn, D. G. (2005).** Environmental pH sensing: resolving the VirA/VirG two-component system inputs for *Agrobacterium* pathogenesis. *Journal of bacteriology*, 187(6), 2182-2189.

**Gaudin V., Vrain T., Jouanin L., (1994).** Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant physiol, Biochem*, 32: 11-29.

**Giri A., Narasu M.L., (2000).** Transgenic hairy roots : recent trends and applications. *Biotechnology advances*. 18: 1-22.

**Giri A., Ravindra S.T., Ghingra V., Narasu M.L., (2001).** Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science*. 81, 4: 378-382.

**Goupy J., (2001).** Introduction aux Plans d'expériences. Dunod. Paris. p.303.

**Goupy J., (2006).** Les plans d'expériences. *Revue MODULAD*, 74-116.

**Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N., (1999).**The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their anti-microbial activity flavour and fragrance journal, 14: 322-332.

**Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati K.P., Rideau M., Gantet P., (2006).**Hairy root research : recent scenario and exciting prospects. Current opinion in plant biology. 9: 341-346.

**Haaland P.D., (1989).**Statistical problem solving. In: Experimental Design in Biotechnology. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc: 1-18.

**Hamill J.D., Parr A.J., Rhodes M.J.C., Robins R.J., Walton N.J., (1987).**New roots to plant secondary products. Biotech, 5: 800-804.

**Hamill J.D., Robins R.J., Parr A.J., Evans D.M., Fuze J.M., Rhodes M.J.C., (1990).** Over-expressing a yeast ornithine carboxylase gene in transgenic roots of *Nicotina rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation. Plant. Mol. Biol, 15: 27-38.

**Harrington Jr. E.C. (1965).** The desirability function. *Ind Qual Control.* 21: 494–8.

**Hill R.A., (1993).** In the chemistry of natural product, 2<sup>nd</sup>edn( Ed.R.H.Thomson), Blackie, Glasgow, 124.

**Hille J.,Hoekema A., Hooykaas P., Schilperoort R.A., (1984).** Gene organization of the Ti plasmid in genes involved in microb-plant interaction.*Ed. Vienna:* 287-309.

**Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.T., (1992).** Agrobacterium and Plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol,* 19: 15-38.

**Hosny A.L., (1978).** Revision of genus *Zygophyllum* L. sections *Pipartia* and *Mediterranean* in Egypt and Arabia. M. Sc. Thesis, Cairo University.

**Hsiou Y.D., Yang W., Hang L., (2000).** Journal of the chinese chemical society, 47, pp. 561-566.

**Hussein., SamehR., Mona M., Marzouk., Lamyaa F., Ibrahim., Salwa A., Kawashty., Nabil A.M., Saleh., (2011).** Flavonoids of *Zygophyllum album* L.f. and *Zygophyllum simplex* L. (*Zygophyllaceae*). Department of Phytochemistry and Plant Systematics,

National Research Centre, Dokki, Cairo 12311, Egypt. *Biochemical Systematics and Ecology*. 08/2011; 39(4-6):778-780.

**Hyum J.K., Hyun S.C., (2007).** Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life Science*, 80: 835-841.

**Jin S., Song Y., Pan S., Nester E.W., (1993).**“Characterization of a virG mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*.” *Mol. Microbiol.* 7 : 555-562.

**Johnson T.M., Das A., (1998).**Organization and regulation of expression of the *Agrobacterium* virulence genes. *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant associated bacteria*: 265-279.

**Judd W.S., Campbell C.S., Kellog E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J., (2002).** *Plant systematics : a phylogenetic approche* Sinauer, Sunferland, Massachusetts, USA.

**Kerstens, K., & De Ley, J. (1984).** Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 936AL. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1, 361-373.

**Kim Y., Wyslouzil B.E., Weathers P.J., (2002).** Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro cell. Dev. Plant* 38: 1-10.

**Kinghorn A.D., Balandrin M.F., (1993).** Human medicinal agents from plants. Washington: ACS Symposium series, 534.

**Kovalenko P.G., Maliuta S.S., (2003).**An effect of transformation by Ri-plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production. *Ukrainica bio organicaacta*, 1, 1: 50-60.

**Ksouri W.M., Medini F., Kadmini K.M., Legault J., Magne C., Abdelly C., Ksouri R., (2013).***Food chemistry*, 2013, 139 (1-4), 1073-1080.

**Lambert C., Thomas G., Leger D., Pamboukdjian N., Tepfer D., (1998).**Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénèse d'arbres fruitiers. 8<sup>ème</sup> colloque sur les recherches fruitières – Bordeaux, Ed INRA-CTIFL, 73-84.

**Lanoué A., Shakourzadeh K., Marison I., Laberche J.C., Christen P., Sngwan-Norreel B., Boitel-Conti M., (2004).** Occurrence of circadian rhythms in hairy root cultures grown under controlled conditions. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 88, n°6: 722-731.

**Li L.P., Jia Y.H., Hou Q.M., Charles T.C., Nester E.W., Pan S.Q., (2002).** A global pH sensor : *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 12369-12374.

**Li, X. Y., & Huang, F. H. (1995).** Effects of acetosyringone, pH and concentration of *Agrobacterium tumefaciens* on putative transient GUS gene expression in *populus*. In *Proceedings-Southern Forest Tree Improvement Conference* (No. 23, p. 220). Louisiana State University, Division of Continuing Education.

**Lièvre K., (2004).** Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (*Rutagraveolens*) par transformation génétique. Thèse Doctorat de l'INPL. p. 197.

**Maiza K., Hammiche V., Brac., Perriere., (1993).** Traditional saharian pharmacopeia. In : Schilcher H., Phillipson J.D., Loew D. (Eds), *ISHS Acta Horticulturae 332: WOCMAP I-Medicinal and Aromatic Plants Conference*. Maastricht, Netherlands.

**Mantis N.J., Winans S.C., (1992).** The *Agrobacterium tumefaciens vir* gene transcriptionally induced by acid pH and other stress stimuli. *Journal of Bacteriology*.(174) 4: 1189-1195.

**Maurel C., Barbier-Brygoo H., Brevet J., Spena A., Tempé J., Guern J., (1991).** *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes and sensitivity of plant protoplasts to auxins, in: "Advances in Mol. Genet. Of plant-micron interaction, vol. 1, Hennecke H and Verma D.P.S; eds. Kluwer Academic pubs., Dordrecht.

**Mayer Hofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren A., Grameri A., Angelis K., Reder G.P., Schell J., Hohn B., Koncz C., (1991).** T-DNA integration a model of illegitimate recombination in plants, *EMBO Journal* 10: 697-704.

**Mohamed Ahmed Shahba., (2010).** *Australian journal of basic and applied science*. 4(8): 3643-3657.

**More D., White J., (2005).** Encyclopedie des arbres plus de 1800 espèces et variétés du monde Flammarion, pp. 18-797.

**Moustafa A., Khodair A.I., Hamouda F.M., Husseiry A., (2007).** Phytochemical and toxicological studies of *Zygophyllum album* L. Journal Pharmacol.Toxicol. 2(3): 220-237. Egypt.

**Moyano, E., Fornalé, S., Palazon, J., Cusidó, R. M., Bonfill, M., Morales, C., & Piñol, M. T. (1999).** Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry*, 52(7), 1287-1292.

**Murakami A., Tanaka T., Lee J-Y., Surch Y-J., Kim H.W., Kawabata K., Nakamura Y., Jiwajinda S., Ohigashi H., (2004).** Zerumbone, Asesquiterpenean subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. International of Cancer, 110, 481-490.

**Murashige M., Skoug., (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.

**Ozenda P (1977).** La flore du sahara, deuxième édition C.N.R.S. Paris, France, p. 662.

**Palazon J., Cusido R.M., Roig C., Pinol M.T., (1997).** Effect of rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production tobacco root cultures. Plant physiol. Biochem, 35, 2, 155-162.

**Palazon J., Cusido R.M., Gonzalo J., Bonfill M., Morales C., Pinol M.T., (1998).** Relation between the amount of rolC gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharathus roseus* transformed root cultures. J. Plant Physiol, 153: 712-718.

**Park S.U., Facchini P.J., (2000).** *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* L and *California poppy*, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. Journal of experimental Botany. 51, 347: 1005-1016.

**Petit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G., Guyon P., (1983).** Further extension of opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet*, 190: 204-214.

**Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W., Sagen H.E., (1930).** Studies on infections hairy root of nursery apple trees. *Journal agricul. Res*, 41: 387-391.

**Sahki A., Sahki R., (2004).** Le Hoggar, promenade botanique. Ed. Esope, Lyon/Chamonix. France, P. 311.

**Sahli F et Gadiri M.N, (2015).** Etude de la sensibilité de *Zygophyllum album* L. aux souches de *Agrobacterium rhizogenes* en vue d'induire, par co-culture, le chevelu racinaire (Hairy root).

**Sasson A. (1991).** Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological economic aspects. *Option méditerranées – série séminaire. 14 : 59-74.*

**Sauerwein M., Shimomura K., (1991).** Alkaloids production in hairy roots for *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Phyto chemistry, 30: 3277-3280.*

**Scriban R., 1999.** Biotechnologie. Ed. Techniques et documentation. Paris, 1042p.

**Sevon N., Oksman-Caldentey K-M., (2002).** *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med 68:859–868.*

**Shimoda N., Toyoda-Yamamoto A., Aoki S., Machida Y., (1993).** Genetic evidence for an interaction between the VirA sensor protein and the ChvE sugar-binding protein of *Agrobacterium*. *J Biol. Chem. 268: 26552-26558.*

**Smati D., (2009).** Contribution to the study of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian sahara, *journal of Ethnopharmacology, Vol. 95, N° 2-3, pp. 405-407.*

**Smith E.F., Townsend C.O., (1907).** A plant tumor of bacterial origin, *Science, 25: 671-673.*

**Souret F.F., Kim Y., Wyslouzil B.E., Wobbe K.K., Weathers P.J., (2003).** Scal-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and bioengineering. 83, 6: 653-669.*

**Stachel, S. E., & Zambryski, P. C. (1986).** virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell, 46(3), 325-333.*

**Tao J., Li L., (2006).** Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*: *South Africa Journal of Botany. 72: 211-216.*

**Tempe J., Goldmann A., (1982).** Occurrence and biosynthesis of opines, p. 428-449 in Kahl G and Schell J.S. Ed. Molecular Biology of plant tumor. *Academic press, Inc, Orlando, Fla.*

**Tepfer D., (1982).** La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacterium rhizogenes*. Deuxième colloque sur les recherches fruitières. Bordeaux, Ed. CTIFL : 46-53.

**Tepfer D., (1984).** Transformation of several species of hight plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37, 959-967.

**Thikhomiroff C., (2002).** Mécanismes de transformation de plantes dicotylédones par *Agrobacterium tumefaciens*. [www. Tikho.com](http://www.Tikho.com).

**Trifonova A.S. et Atanassov A.I., 1999.** Studies on genetic transformation of apple. *Acta Hort.* 484 : 591-593.

**Tsao R., Coats J.R., (1995).** Starting from nature to make batter insecticides. *Chemtech*, 25: 23-28.

**Valdès L.J., (1994).** Psychoactive drugs. 26, pp. 277-283.

**Vallet A., (1996).** Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill ; transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus racinaires. DEA. Génie enzymatique, bioconversion et microbiologie. Université de Picardie Jules Verme.

**Velickovic A.S., Ristic M.S., Velikovic D.T., Ilicand S.N., Mitic N.D., (2003).** *J. Serb. Chem. Soc*, 68 (6), pp. 435-445.

**Verpoorte R., Van der Heijden R., Van Gulik W., (1991).** Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. Brossi A. (Ed) *the alkaloids*, Academic press, San Diego, 40: 1-187.

**White A., (2006).** Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* Mill ; transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus racinaires. Univ. Picardie Jules Verne, Fac. Des Science, Amiens.

**Wise, A. A., Voinov, L., & Binns, A. N. (2005).** Intersubunit complementation of sugar signal transduction in VirA heterodimers and posttranslational regulation of VirA activity in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 187(1), 213-223.

**Woo S.S., Song J.S., Lee J.Y., Su in D., Chung H.J., Liu J.R., Choi D.W., (2004).** Selection of high ginsenoside producing ginseng hairy root lines using targeted metabolic analysis. *Phytochemistry*. 64: 2751-2761.

**Zambryski P.C., (1992).** Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol*, 43: 465-490.

**Zambryski P.C., Tempe J., Schell J., (1989).** Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants, *cell*, 56: 193-201.

**Zhi-Bi H., Min D., (2006).** Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of integrative plant biology*. (48) 2: 121-127.

**Zhu J., Oger P.M., Schrammeijer B., Hooykaas P.J., Farrand S.K., Winans S.C., (2000).** The bases of crown gall tumorigenesis, *Journal of Bacteriology* 182(14): 3885-3895.

## Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Résumé	
INTRODUCTION .....	1
<b>I. Synthèse bibliographique</b>	
1.1. Modèle végétal: <i>Zygophyllum album</i> L.....	4
1.1.1. Classification et description botanique.....	4
1.1.2. Répartition géographique. ....	5
1.1.3. Contenu en métabolites secondaires.....	5
1.1.4. Intérêt Médicinal et utilisation.....	6
1.2 Induction de chevelus racinaires par <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	6
1.2.1. Organisation du Plasmide <i>Ri</i> d' <i>A. rhizogenes</i> . ....	7
1.2.2. Mécanismes moléculaires du transfert de l'ADN-T.....	9
1.3. Production des chevelus racinaires par voie biotechnologique.....	11
1.3.1. Avantages et intérêt des chevelus racinaires. ....	12
1.3.2. Facteurs influençant l'induction des chevelus racinaires par <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . ....	12

1.3.3. Protocoles de production des chevelus racinaires. ....	13
1.3.4. Confirmation de la transformation génétique.....	15
II. Partie expérimentale	
2.1. Matériel et Méthodes.....	17
2.1.1. Matériels.....	17
A. Matériel biologique.....	17
A.1. Matériel végétal .....	17
A.2. Souche bactérienne A <sub>4</sub> d' <i>A. rhizogenes</i> .....	18
B. Matériel non biologique.....	18
2.1.2. Méthodes .....	19
a. Echantillonnage.....	19
b. Préparation des milieux de cultures.....	19
c. Désinfection des graines de <i>Z. album</i> .....	21
d. Activation de la souche A <sub>4</sub> d' <i>A. rhizogenes</i> .....	21
e. Suractivation des gènes Vir: étude de l'effet du saccharose et du pH.....	22
f. Co-culture bactérie-plante et Isolement des racines induites.....	23
g. Plan d'expérience et Modélisation mathématique.....	25
h. Caractérisation biochimique et sélection des lignées de chevelus racinaires....	29
2.2. Résultats et Discussion.....	31
2.2.1. Résultats.....	31
A. Obtention du matériel végétal destiné à l'infection.....	31
B. Effets du saccharose et du pH sur l'induction des chevelus racinaires.....	32
B.1. Le taux de réactivité ( $Y_{Réac.}$ ).....	33
B.2. Rendement des CRs induits ( $Y_{Rdt}$ ).....	35
B.3. Conditions optimales d'obtention de CRs.....	37

C. Caractérisation biochimique des lignées de CRs.....	38
2.2.2. Discussion.....	41
A. Sensibilité de <i>Z. album</i> à l'infection par la souche bactérienne sauvage A <sub>4</sub> ...	41
B. Effet du pH sur l'obtention des CRs.....	42
C. Effet du saccharose sur l'obtention des CRs.....	42
D. Effet de l'interaction sucre x pH sur l'obtention des CRs.....	43
E. Caractérisation biochimique des lignées de CRs.....	44
Conclusion .....	45
Références bibliographiques .....	46