

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Blida 1

جامعة البليدة 1

Faculté des sciences de la vie et de la nature

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم بيولوجيا تجمعات الكائنات الحية

Département 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

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).

Présenté par :

Soutenu publiquement le : 28/juin/2015

Mme SAHLI Fatiha

Mr GADIRI Mohamed Nassim

Devant le Jury :

Président : Mme OUATTAR F

MCB /BPO Blida 1

Examineur1 : Mme FAIDI H

MCB /BPO Blida 1

Examineur2 : Mme METIDJI H

MAA /BPO Blida 1

Promoteur : Mme AYADI R

MCB /BPO Blida 1

Co-Promoteur : M. AMDOUN R

Maître de recherche A / INRF

Année universitaire : 2014-2015

Dédicace

*A tous ceux qui
nous ont soutenus*

Remerciements

Nous tenons à remercier Monsieur **NEDJAH**, Directeur Général de l'Institut National de Recherche Forestière, de nous avoir facilité la réalisation de ce modeste travail.

Nos remerciements vont à Madame **AYADI** Maître de conférence à l'Université Blida 1 pour son encadrement.

Nous remercions vivement Monsieur **AMDOUN** Maître de recherche A à l'INRF pour sa contribution à ce travail.

Nous remercions Madame **OUATTAR** Maître de conférence à l'Université Blida 1 d'avoir accepté de présider la soutenance.

Nos remerciements vont également à :

Mme **FAIDI** Maître de conférence B à l'Université Blida 1 et

Mme **METIDJI** Maître assistante A à l'Université Blida 1 pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury.

Mme **IDGER**, Mme **BERKA** et Mme **SAI** chercheurs à l'INRF.

Monsieur **KEBBAB** technicien au Laboratoire *in vitro* de l'INRF.

Que Monsieur **KHELIFI** Professeur à l'ENSA d'El Harrach et Madame **ZAOU** Ingénieur au laboratoire de Biotechnologies de l'ENSA trouvent ici l'expression de notre reconnaissance pour nous avoir fournis la souche bactérienne et l'acétosyringone.

Et enfin un grand MERCI à toute la promotion « *Génomique et Biotechnologie Végétale 2014 – 2015* » qui nous a bien intégrés dans le groupe.

Liste des abréviations

CCD : Central Composit Design.

DO₆₀₀ : Densité optique mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 600\text{nm}$.

MS : Milieu de culture de Murashige et Skoog.

YEB : Yeast Extract Broth

YEM : Yeast Extrait Mannitol.

Y_{Ind} : Pourcentage d'induction

Y_{NMRE} : Nombre moyen de racine par explant

Y_{Réac} : Pourcentage de réactivité

Y_{Temps} : Temps moyen d'apparition de la première racine

μM : micromole.

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition du milieu de culture MS.....	18
Tableau 2. Composition chimique du milieu YEM.....	19
Tableau 3. Valeurs codées et réelles des concentrations de l'acétosyringone et du glucose...25	
Tableau 4. Résultats obtenus après l'application du CCD.....	30

Liste des figures

Figure 1. <i>Zygothallum album</i> . A : Partie aérienne - B : Feuille et Fruit.....	3
Figure 2. Plasmide Ri d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	8
Figure 3. Représentation schématique d'une infection par <i>Agrobacterium</i>	9
Figure 4. Méthode de préparation des suspensions bactériennes.....	20
Figure 5. Méthode de l'infection et de co-culture plante-bactérie.....	22
Figure 6. Exemple de domaine de variation du facteur 1 (X_1) : Acétoxyringone.....	24
Figure 7. Plan d'expérience CCD et niveaux de chacun des deux facteurs.....	26
Figure 8. Vitrosemis de huit (8) semaines destinés à la transformation génétique.....	29
Figure 9. Graphique de Pareto standardisé pour $Y_{Réac}$	31
Figure 10. Explants de <i>Z. album</i> ayant formé un cal suite à l'infection par la souche A_4 d' <i>A. rhizogenes</i> : formation de cal (Gr : 10 x 12)	32
Figure 11. Graphique de Pareto standardisé pour Y_{Ind}	33
Figure 12. Induction de CRs sur les explants de <i>Z. album</i> suite à l'infection par la souche A_4 d' <i>A. rhizogenes</i> (Gr : Gr : 10 x 12).....	34
Figure 13. Graphique de Pareto standardisé pour Y_{Temps}	35
Figure 14. Graphique de Pareto standardisé pour Y_{NMRE}	36
Figure 15. Surface de réponse des valeurs de désirabilité globale (D) en fonction de la concentration de l'acétoxyringone et du glucose.....	37
Figure 16. Quelques lignées de CRs obtenues.....	38

ملخص

هي نبتة من عائلة زيغوفيلاسي ذات خصائص طبية هامة نظرا لما تحتوي عليه من المركبات الثانوية . *Zygothymum album* تمثل وسيلة *Agrobacterium rhizogenes* إنتاج هذه الأخيرة باستعمال الجذور الشعرية المتحصل عليها عن طريق بكتيريا *Glucose* و *Acetosyringone* ناجعة للإنتاج بالمقارنة مع غيرها من التقنيات الأخرى (زراعة الحقول... الخ). تظهر دراسة تأثير المضاف للمحلول البكتيريا يقوم بتحسين عدد الجذور الشعرية المتحصل عليها في وقت قصير و *Glucose* على تكوين الجذور الشعرية أن "علي عدد الجذور الشعرية و الوقت *Acetosyringone-Glucose* لها تأثير معاكس. إلا أن تأثير المزوج " *Acetosyringone* أن لتحصل عليها له فعالية أكثر. النتائج المتحصل عليها باستعمال النمادج الرياضية لتحسين إنتاج الجذور الشعرية هي : *acetosyringone* (11,25 µM) *glucose* (8,5 g/l)

هذه النتائج تسمح بالحصول علي: .87% de réactivité, 8% d'induction de racines et 3 racines/explant. كلمات البحث: بكتيريا A₄ - من الجذور الشعرية - الزراعة المزوجة *Zygothymum album* .

Résumé

Zygothymum album est une *Zygothymaceae* présentant des propriétés médicinales importantes vu les métabolites secondaires qu'elle renferme. La production de ces derniers par les chevelus racinaires, induits par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, pourrait être prometteuse par rapport aux autres techniques de production (culture en plein champs...etc). Dans notre étude, on vise à modéliser l'induction de chevelus racinaires en fonction de l'acétosyringone et du glucose. Le plan d'expérience appliqué est le Central Composit Design. L'étude de l'influence de l'acétosyringone et du glucose sur l'induction des CRs sur des explants de *Z. album* montre que le glucose rajouté à la suspension bactérienne augmente la formation de cals, le nombre des racines par explant et améliore la précocité d'apparition des racines ; par contre l'addition de l'acétosyringone a un effet contraire. Cependant l'effet de l'interaction du couple [acétosyringone – glucose] améliore la précocité d'apparition des racines et le nombre des CRs induits. Les modèles mathématiques obtenus ont permis le calcul des valeurs optimales de l'acétosyringone (11,25 µM) et du glucose (8,5 g/l) qui permettraient d'obtenir en 12 jours après l'infection, 87% de réactivité, 8% d'induction de racines et 3 racines/explant.

Mots clés : *Agrobacterium rhizogenes*, Chevelu racinaire, Co-culture, *Zygothymum album*.

Summary.

Zygothymum album is a *Zygothymaceae* with significant medicinal properties according to the secondary metabolites that it contains. The production of those secondary metabolites by the hairy roots, induced by *Agrobacterium rhizogenes* could be promising compared with other technical productions (field cultivation ... etc). Our study aims to modelization of the hairy root induction according to acetosyringone and glucose concentrations. The Central Composit Design is used for experiment. The study of the influence of acetosyringone and glucose on the induction of hairy roots of *Z. album* explants shows that the glucose added to the bacterial suspension increases callus formation, the number of roots per explant and improves precocity of appearance of roots. The study show also that the addition of acetosyringone has the opposite effect. However , the effect of the interaction of acetosyringone and glucose improves precocity of appearance of roots and the number of hairy roots induced. The resulting mathematical models allowed the calculation of the optimal values of acetosyringone (11.25 microM) and glucose (8.5 g / l) that would obtain in 12 days after infection, 87% of reactivity, 8% root induction and three roots / explant.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes* - hairy root - Co-culture - *Zygothymum album*.

Introduction

De nombreuses recherches sur les espèces médicinales des régions arides ont montré une grande richesse en métabolites secondaires tels que les : hétérosides, essences à terpènes ou à dérivés de phényl-propane, lignanes, résines, gommés et qu'un grand nombre d'entre elles contient des alcaloïdes (Chopra *et al.*, 1960).

En Algérie, les espèces spontanées des régions arides et semi-arides constituent une importante ressource naturelle diversifiée présentant un grand intérêt scientifique et économique. Elles fournissent notamment de nombreux composés tels que les arômes, les antioxydants, les huiles, les parfums, les cosmétiques et les molécules actives. Ces espèces contiennent des composants actifs utilisés dans le traitement de diverses maladies. Parmi celles-ci, les halophytes présentent une forte activité biologique. Actuellement, un intérêt croissant est accordé à ces espèces en raison de leur teneur élevée en molécules bioactives (Megdiche Ksouri *et al.*, 2013). Les espèces de la famille des *Zygophyllaceae* à titre d'exemple sont antidiabétique, anti-oxydante, antimicrobienne et cytotoxique (Ayad, 2010). L'halophyte *Zygophyllum album* L. connue pour ses vertus thérapeutiques, notamment contre le diabète, pourrait présenter une importante ressource naturelle de métabolites secondaires d'un grand intérêt médicinal.

Les métabolites secondaires sont présents à très faible quantité dans la plante entière (Toivornen, 1993 ; Kim *et al.*, 2002), leur production par synthèse chimique reste trop onéreuse (Kim *et al.*, 2002). Toutefois, la possibilité de produire ces composés par voie biotechnologique en utilisant un tissu spécialisé en racine est prometteuse car, beaucoup de métabolites secondaires sont synthétisés au niveau des racines (Flores *et al.*, 1999). En effet, leur production à partir de chevelus racinaires obtenus par transformation génétique à l'aide de la bactérie *Agrobacterium rhizogenes* est une approche intéressante vue leur stabilité génétique, leur croissance rapide et leurs rendements accrus par rapport à celle d'une racine naturelle ou même à la plante

entière (Verpoorte et Memelink, 2002 ; Barakat Makhzoum, 2007 ; Srivastara et Srivastara, 2007).

L'*Agrobacterium rhizogenes* est une bactérie du sol qui infecte les plantes au niveau des blessures. Le mécanisme d'infection de la plante par *A. rhizogenes* se fait en trois étapes : adhésion bactérie – plante ; activation des gènes de virulence *vir* puis transfert et intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule hôte (Tepfer, 1982 ; Scriban, 1999).

Lors de l'infection, les gènes *vir* de *A. rhizogenes* sont activés par des signaux chimiques provenant de la plante blessée parmi lesquels les composés phénoliques tel que l'acétosyringone ; les monosaccharides et le pH acide (Lee *et al.*, 1996 ; Gelvin, 2003 ; Tzfira *et al.*, 2004). La réaction de la plante à l'infection se traduit par la formation d'une tumeur sous forme de chevelus racinaires caractérisés par une croissance rapide et un rendement élevé en métabolites secondaires (Souret *et al.*, 2003 ; Kovalenko et Maliuta, 2003).

L'objectif de ce travail est d'étudier la sensibilité de *Z. album* à l'infection par *Agrobacterium rhizogenes* (souche A₄) en vue d'induire les chevelus racinaires (Hairy roots). Deux facteurs influençant l'induction ont été testés : Il s'agit de l'acétosyringone (composé phénolique) et du glucose.

Le présent travail s'articule autour de trois parties. La première partie est une synthèse bibliographique sur *Z. album* et *A. rhizogenes*, la deuxième partie décrit les matériels et méthodes utilisés lors des différentes expérimentations et la troisième partie expose et discute les résultats obtenus.

1. *Zygophyllum album*

Zygophyllum album, « aggaya » en arabe et "abelkozt en tamahek, est une espèce de la famille des Zygophyllaceae qui comprend environ 25 genres et 500 espèces, formant plus de 3% de la flore du désert (Ozenda, 1977).

1.1. Description botanique

Zygophyllum album (Figure 1 A) est une espèce vivace, se présentant sous forme de buisson bas, ramifié de 20 à 30 cm de hauteur. Les feuilles sont petites, succulentes, opposées deux à deux folioles cylindriques charnues. Les fleurs sont blanches ou jaunâtre, axillaires à base élargie possédant 10 étamines. L'ovaire anguleux a 5 lobes plus ou moins saillants. Le fruit (Figure 1 B) est une capsule portée par un pédoncule court. Elle est formée d'une partie inférieure soudée et d'une partie supérieure dont les 5 lobes libres ont à peu près la même longueur que la partie soudée (Quezel et Santa 1962 ; Ozenda 1977 ; Sahki, 2004). Parfaitement adaptée à la sécheresse, *Z. album* présente un réseau racinaire important sous forme de rhizomes et de fines soies sur les feuilles qui permettent de retenir la vapeur d'eau.



Figure 1. *Zygophyllum album*. **A** : Partie aérienne - **B** : Feuille et Fruit.

(Source www.sahara-nature.com/image_aff.)

1.2. Répartition et écologie

La famille des *Zygophyllaceae* est présente dans tous les continents et principalement dans les régions arides. Le genre *Zygophyllum* est représenté par sept espèces en Afrique du Nord dont quatre sont endémiques au Sahara (Ozenda., 1977).

Zygophyllum album est une espèce saharo-méditerranéenne commune dans le sud tunisien, moins fréquente en Algérie (Ozenda., 1977). On le trouve principalement dans les régions arides du Sahara septentrional au Tidikelt et au Touat (Sahki et Sahki, 2004). Au Sahara central, il est signalé dans l'Ahaggar, à Fort-Polignac et dans la région d'El Goléa (Sahki et Sahki, 2004).

Cette espèce colonise les sols à encroûtements gypseux des bordures des chotts et des sebkhas. Cette plante est également liée aux sols à alcalis ou salins. Elle présente une grande amplitude écologique. Elle pousse sous des précipitations allant de 3mm/an à 158 mm/an (Fahmy et Ouf, 1999).

1.3. Contenu phytochimique et intérêt médicinal

Les *Zygophyllaceae* biosynthétisent des métabolites secondaires majoritaires variés parmi lesquels figurent les alcaloïdes β -carboline, les flavonoïdes, et les constituants lipidiques (Moustafa *et al.*, 2007).

Pour les alcaloïdes β -carboline, l'harmine a été isolé et identifié comme constituant majeur. L'harmine ($C_{13}H_{12}N_2O$), est un tranquillisant (antidépresseur), il est actif contre les stimulants de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), et est efficace pour le traitement de la paralysie et la maladie du Parkinson (Ginzburg, 2003).

Les principaux constituants flavonoïdes comprennent kaempférol, isorhamnétine et quercétine-3O-glucoside. La quercétine présente une activité anti-inflammatoire significative (Park et Facchini, 2000). D'après Khaldi *et al.* (2012), les flavonoïdes extraits des feuilles de *Zygophyllum* constituent un effet inhibiteur sur *Alternaria* qui est un champignon dont les spores sont la cause de rhino-conjonctivites.

L'isolement et l'identification de la fraction lipidique ont donné lieu à 16 n-alcane (C_{12} - C_{32}) avec $C_{26}H_{54}$ comme constituant majeur et β -amyrine, le stigmastérol, le β -sitostérol et neuf acides gras. Les principaux acides gras sont l'acide décanoïque et l'acide palmitique (Moustafa *et al.*, 2007).

D'autres auteurs ont identifié d'autres métabolites parmi lesquels, les terpènes et les saponines (Ayad, 2010 ; Medjdoub, 2013 ; Megdiche-Ksouri, 2013).

Zygophyllum album L. est une plante utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle pour des usages thérapeutiques contre le rhumatisme, la goutte, l'asthme et l'hypertension. Elle est également utilisée comme diurétique, anesthésique local, antihistaminique, agent antidiabétique, carminative, antiseptique et stimulant (Meng *et al.*, 2002).

L'évaluation de l'effet de l'extrait de *Z. album* sur des souris diabétiques a montré une diminution significative de l'activité du glucose dans le sang, la peroxydation des lipides dans le foie et le pancréas, une augmentation significative des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques de systèmes de défense telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx), la vitamine C, la glutathion réductase (GSH) et une diminution significative de la vitamine E. Ces résultats suggèrent que les composés de l'extrait de *Z. album* pourraient exercer leurs activités antidiabétiques par leurs propriétés antioxydantes (El Ghoul *et al.*, 2011 ; Boughalleb *et al.*, 2012).

En 2012, Larouadi et Harkouk constatent que le décocté de *Z. album* a une action antihyperglycémiant qui serait due à une potentialisation de la sécrétion de l'insuline par les cellules β ainsi qu'à une augmentation de l'utilisation du glucose par les organes périphériques.

Des activités anticancéreuses en particulier contre les lignées cellulaires de carcinome du poumon et une importante activité anti-inflammatoire ont été mises en évidence. Ces données suggèrent que cette halophyte pourrait être une source précieuse

de métabolites secondaires et une source prometteuse de produits de santé pour les aliments fonctionnels ou nutraceutiques (Megdiche-Ksouri *et al.*, 2013).

Une étude sur l'effet de l'huile essentielle de *Z. album* chez les rats diabétiques a montré une diminution significative de la glycémie de 60% par comparaison avec les animaux diabétiques non traités. Elle a démontré également qu'elle exerce des effets antihypertenseurs par inhibition des enzymes digestives et les activités des lipides ACE (angiotensin-converting enzyme) et qu'elle atténue les symptômes de la diarrhée (Mnafgui *et al.*, 2014).

Z. album est aussi un analgésique et un désinfectant (Ould El Hadj *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont montré qu'une exposition importante au pesticide bifenthrine (pyréthrinoïde de synthèse) utilisé en agriculture pose un véritable problème de santé publique. Il est associé à des effets néfastes tels que la néphrotoxicité, la neurotoxicité, l'ulcère des intestins et de l'estomac ainsi que l'hématotoxicité. Le co-traitement par *Z. album* a conduit à la suppression des perturbations biochimiques et cytomorphologiques, comparativement aux rats exposés non traités (Feriani, 2014).

2. *Agrobacterium rhizogenes* et transformation génétique

Agrobacterium est une bactérie capable de transférer naturellement de l'ADN vers une cellule végétale dans le but de détourner à son profit l'activité métabolique cellulaire (Wlodarczyk, 2010). Les trois espèces les plus connues sont : *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* et *A. vitis* qui infectent principalement les plantes dicotylédones (Diouf, 1996 ; Umber, 2004 ; Wlodarczyk, 2010).

La bactérie transforme génétiquement les cellules végétales infectées grâce à la présence d'un plasmide de grande taille appelé Ti pour "Tumour-inducing" dans le cas d'*A. tumefaciens* et *A. vitis*, ou Ri pour "Root-inducing" dans le cas de *A. rhizogenes* (Moore *et al.*, 1988 ; White, 1996). Ce plasmide porte le fragment d'ADN qui est transféré dans la cellule végétale, appelé T-DNA (pour "Transferred-DNA" (Chilton *et al.*, 1977), et les gènes *vir* (virulence).

2. 1. Description d'*Agrobacterium rhizogenes* et cartographie du plasmide *Ri*

Agrobacterium rhizogenes a été découvert en 1930 (Riker *et al.*, 1930). Il appartient à la famille des *Rhizobiaceae*. Le genre *Agrobacterium* désigne des bacilles d'environ 1 x 3 microns Gram négatifs, aérobies et mobiles par des flagelles. *Agrobacterium rhizogenes* (Figure 2) contient un mégaplasme circulaire d'environ 250 kpb appelé plasmide Ri ("Root inducing plasmid" = pRi) qui comprend plusieurs régions dont trois particulièrement importantes (Tourte, 1998) :

- Une région contenant l'origine de réplication,
- Une région correspondant à l'ADN de transfert ou ADN-T,
- Une région *vir* contenant divers gènes influençant la propriété de virulence de la bactérie.

Les ADN-T comprennent un certain nombre de gènes dont des gènes de synthèse d'hormones végétales ou les oncogènes qui vont permettre la prolifération cellulaire et aider à la formation des racines et des gènes pour la biosynthèse des opines (Abid,

1995). Les opines sont de petites molécules résultant de la condensation d'un acide aminé et d'un sucre ou d'un acide α -cétonique qui constituent une source de carbone et d'azote pour les bactéries. Dans les souches à agropine est présent un deuxième ADN-T qui porte des gènes de synthèse d'auxine, *aux1*, *aux2* et *rolB* TR (Diouf, 1996).

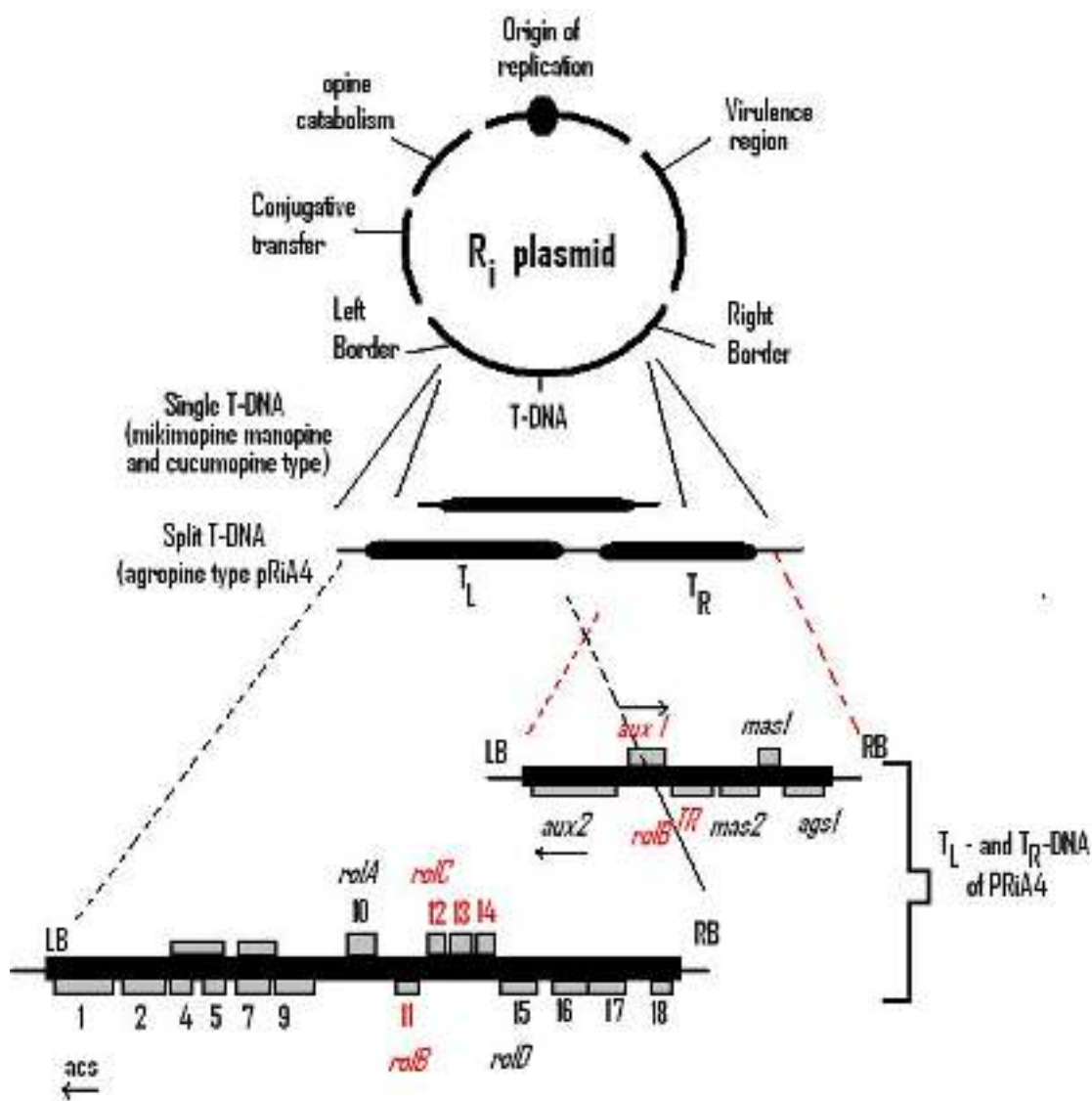


Figure 2. Plasmide Ri d'*Agrobacterium rhizogenes* (Shoja, 2010)

2.2. Mécanisme d'infection

Le mécanisme d'infection par *A. rhizogenes* (Figure 3) se fait en trois étapes : adhésion bactérie- plante, activation des gènes de virulence *vir* et transfert du ADN-T plasmidique vers la cellule hôte.

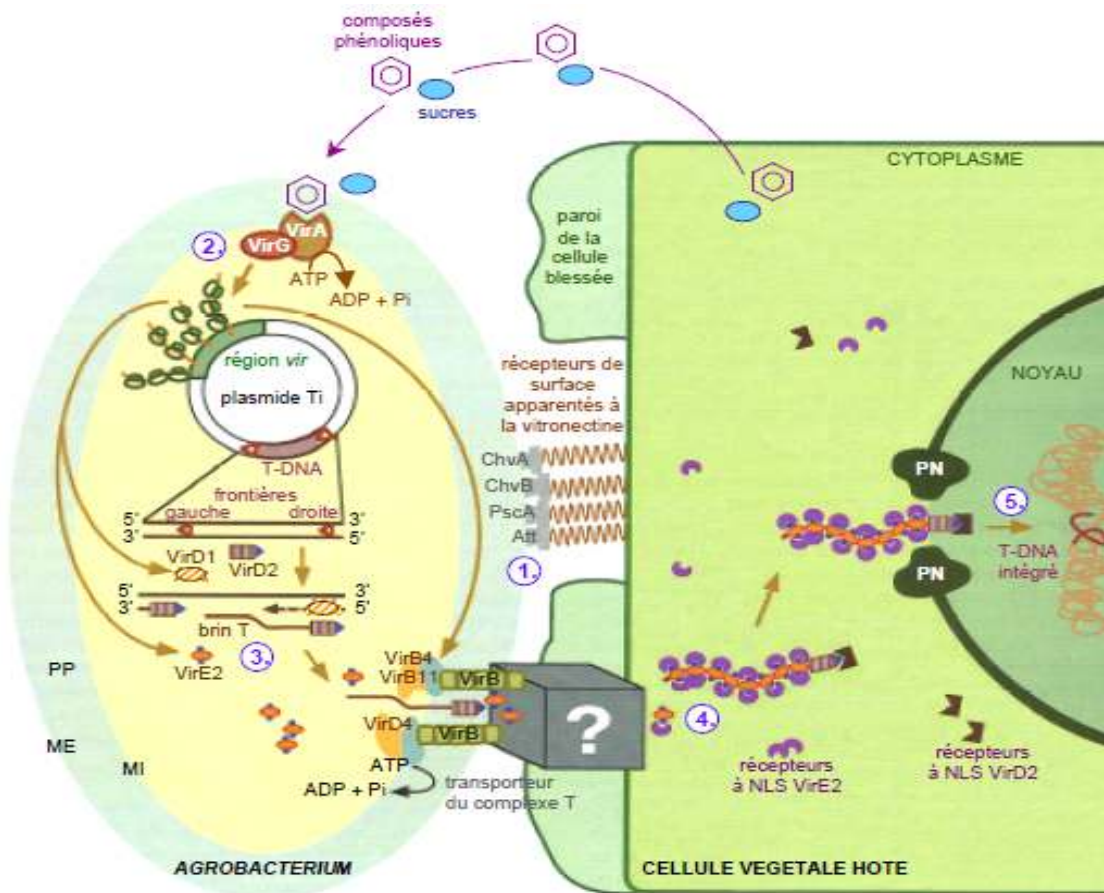


Figure 3. Représentation schématique d'une infection par *Agrobacterium* (Umber 2004)

1 : Attachement de la bactérie à la surface de la cellule hôte grâce à l'ensemble des gènes *chv* (chromosomal virulence) présents sur le chromosome bactérien ; 2 : Induction des gènes *vir* par des signaux de la plante. ; 3 : Production du brin T et assemblage du complexe T. 4 : Exportation et transport vers le noyau de la cellule végétale ; 5 : Intégration du T-DNA dans un chromosome de l'hôte ; ME : membrane externe ; MI : membrane interne ; PN : pore nucléaire ; PP : périplasma.

2.2.1. Adhésion bactérie – plante

La plante blessée libère divers composés, notamment des sucres et des composés phénoliques auxquels *A. rhizogenes* est particulièrement sensible. Attirée par ces composés, la bactérie progresse jusqu'à la source et un contact physique s'établit alors entre elles (Davet, 1996 ; Scriban, 1999). La stabilisation de la liaison bactérie-plante se fait grâce au locus *pscA* (ou *exoC*) et aux deux loci liés *chvA* et *chvB*, qui permettent la synthèse et l'excrétion de polysaccharides de type β -1-2 glucane, et aux fibrilles de cellulose impliquant le locus *cel*. Ces gènes de virulence chromosomiques sont exprimés constitutivement par la bactérie (Mathysse et Gurlitz, 1982).

2.2.2. Activation des gènes *vir*.

Les gènes de virulence plasmidiques de *A. rhizogenes* impliqués dans le transfert du T-DNA (*virA*, *virB*, *virD* et *virG*) et certains gènes chromosomiaux (chrE *acvF*) sont nécessaires à l'activation du processus d'infection quel que soit l'hôte. La composition des exsudats des cellules blessées influe sur l'activation des gènes *vir* parmi lesquels les composés phénoliques comme l'acétosyringone, l'un des premiers composés phénoliques identifié comme inducteur spécifique des gènes *vir*, les monosaccharides, tel que le glucose et le pH acide (Stachel *et al.*, 1986 ; Davet, 1996 ; Giri et Narasu, 2000).

2.2.3. Insertion de la T-DNA dans le génome de la cellule

Le transfert de l'ADN-T rappelle en de nombreux points la conjugaison bactérienne (Umber, 2004). A son entrée dans la cellule végétale, le brin T est recouvert de la protéine VirE2 qui protège l'ADN simple brin contre les nucléases de la cellule végétale. L'intégration du fragment de quelques milliers de paires de bases, délimité à chaque extrémité par des bordures constituées de la même séquence de 25 paires de bases, semble faire intervenir VirD2, qui couperait l'ADN de la plante, ainsi que des protéines cellulaires. L'intégration de l'ADN-T dans le génome nucléaire se fait au hasard dans les parties qui sont régulièrement transcrites (Davet, 1996 ; Scriban, 1999 ; Thikhomiroff, 2002).

2.3. Réaction de la plante à l'infection

Ce sont trois gènes agissant de concert qui sont responsables de l'apparition des racines et de leur phénotype : les gènes *rol A*, *rol B*, *rol C* (Winans *et al.*, 1992 in Abid, 1995) :

- L'expression du gène *rolA* est déterminante pour l'établissement du phénotype des chevelus racinaires (Cardarelli *et al.*, 1987 in Flores et Medina-Bolivar, 1995).

- Le gène *rolB* augmente la sensibilité des cellules envers les auxines (Vallet A., 1996). L'augmentation de l'activité auxinique induit une modification morphologique des plantes lors de la floraison et une augmentation des nombres de racines sur les tiges (Nilsson *et al.*, 1993).

- Le gène *rolC* permet de libérer les cytokinines actives à partir de leur forme glucosidique conjuguée (Estruch *et al.*, 1991). Le gène *rolC* augmente la capacité de croissance des racines transformées, réduit la dominance apicale, la production des graines et altère la morphologie des feuilles (Schmülling *et al.*, 1988).

L'intégration de l'ADN-T au génome de la cellule va permettre la production des opines, hormones végétales, et la formation de tissus particuliers. Ainsi, *Agrobacterium rhizogenes* va entraîner la maladie du chevelu racinaire.

3. Les chevelus racinaires

3.1. Avantages et intérêts

Les chevelus racinaires se manifestent par l'apparition d'un grand nombre de racines comportant de nombreux poils racinaires sur le lieu de la blessure. Ils présentent une physiologie particulière et une stabilité génétique (Giri et Narasu, 2000 ; Woo *et al.*, 2004). Ils ont une croissance plagiotrope (David *et al.*, 1984 ; Tepfer, 1984) et rapide comparée aux racines naturelles mais variable en fonction des espèces et des variétés considérées (Kim *et al.*, 2002 ; Lanoue *et al.*, 2004 ; Zhi-Bi et Min, 2006).

Les chevelus racinaires se distinguent par la capacité de synthétiser une large gamme de métabolites secondaires et en fournissent une source de production continue, car l'extraction de ces derniers ne nécessite pas la destruction de la biomasse (Souret *et al.*, 2003 ; Lanoue *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2004 ; Guillon *et al.*, 2006).

Cultivés *in vitro*, les chevelus racinaires peuvent accumuler des métabolites secondaires présents uniquement dans les parties aériennes de la plante intacte (Kim *et al.*, 2002) et de produire de nouveaux composés qui ne sont pas naturellement synthétisés par les racines non transformées (Zhi-Bi et Min, 2006).

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

Plusieurs facteurs se sont avérés déterminants pour l'induction des chevelus racinaires. La réponse de la plante à l'infection dépend de la souche bactérienne et de la plante elle même (Park et Facchini, 2000). En effet, les différentes souches de *A. rhizogenes* présentent des virulences variables d'une souche à une autre (Giri *et al.*, 2001). Certaines n'induisent aucune réaction ou seulement la formation de cals alors que d'autres, la formation de chevelus racinaires (Ercan et Taskin, 1999 ; Park et Facchini, 2000 ; Giri *et al.*, 2001). La concentration bactérienne joue un rôle important dans l'efficacité d'induction de chevelus racinaires chez les végétaux, une faible concentration se traduit par une faible disponibilité des bactéries pour la transformation

des cellules de la plante, 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). La meilleure concentration bactérienne se situe au niveau d'une $DO_{600}=0,5$ (Dhakulkar *et al.*, 2005).

Le facteur génotype est très important pour la réponse à la transformation, certaines espèces sont réactives, d'autres récalcitrantes (De Cleen et De Ley, 1981 *in* Dhakulkar *et al.*, 2005 ; Ecran et Taskin, 1999). La même espèce de différentes provenances pourrait présenter des réponses diverses à la transformation. Ecran et Taskin (1999) signalent que la même souche de *A. rhizogenes* induit chez quatre populations de *Rubia tinctorum* différents taux de réactivité.

Des composés phénoliques activateurs de la virulence comme l'acétosyringone qui, ajoutés au milieu de suspension bactérienne, jouent un rôle dans l'efficacité d'induction des chevelus racinaires et permettent un gain en temps d'apparition des racines (Hu *et al.*, 1993 *in* Giri et Narasu, 2000 ; Tao et Li, 2006). Certains sucres également sont connus pour stimuler la virulence.

Le pH du milieu est un facteur très important pour l'induction des chevelus racinaires. Les gènes liés à la transformation codent mieux dans un environnement acide. Ainsi, le pH induisant la virulence est en général plus acide (pH inférieur à 5,7) que celui des milieux utilisés pour la culture des végétaux (5,7-5,8) (Mantis et Winans, 1992 ; Li *et al.*, 2002 ; Gao et Lynn, 2004 ; Lièvre, 2004).

D'autres paramètres tels que le type et l'âge de l'état physiologique de l'explant (tige, racine, hypocotyle...etc), joueraient un rôle dans l'efficacité de l'induction (Diouf, 1996 ; Karmarkar, 2001 ; Amdoun *et al.*, 2006).

3.3 Production des chevelus racinaires

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

- Culture et activation de la bactérie *A. rhizogenes*,
- Infection et co-culture plante-bactérie,
- Isolement des chevelus racinaires induits.

3.3.1. Préparation de la bactérie et suractivation des gènes *vir*.

Pour la préparation et l'entretien des bactéries, différents milieux sont utilisés : Pour Giri *et al.* (2001) et Dhakulkar *et al.* (2005), l'entretien des bactéries se fait sur l'Agar nutritif, Tao et Li (2006) utilisent le milieu YEB (Yeast Extract Broth). Amdoun *et al.* (2008) montrent que les conditions optimales pour l'induction des chevelus racinaires chez le *Datura stramonium* sont l'utilisation de la souche A₄ suspendue dans le milieu de culture YEM (Yeast Extract Mannitol). Ceci permet d'améliorer la précocité d'apparition des racines par rapport au milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) selon les mêmes auteurs.

La suractivation des gènes *vir* est obtenue en ajoutant l'acétosyringone soit au milieu de suspension de la bactérie (Kovelenko et Maliuta, 2003) soit aussi bien au milieu de suspension qu'au milieu de co-culture (Giri *et al.*, 2001 ; Tao et Li, 2006).

L'incubation des bactéries se fait à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant une période allant de 16 à 30 heures, permettant d'obtenir une biomasse suffisante pour préparer les suspensions bactériennes qui sont préparées avec le milieu MS en général (Kovelenko et Maliuta, 2003 ; Dhakulkar *et al.*, 2005 ; Tao et Li 2006).

3.3.2. Infection et co-culture plante-bactérie

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

- Infection par piqûre d'organes végétaux tels que la tige, la racine, l'hypocotyle et les feuilles. L'infection se fait par dépôt à l'aide d'une aiguille assurant la lésion des tissus et l'introduction de *Agrobacterium*. La co-culture se fait à l'obscurité à $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Les repiquages sont nécessaires jusqu'à l'apparition des racines transformées (Vallet, 1996 ; Amdoun *et al.*, 2006).

- Infection par immersion : les cultures bactériennes sont utilisées pour l'infection des explants en les incubant 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).

3.3.3. Isolement et mise en culture *in vitro* des chevelus racinaires

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

3.3.4. Confirmation de la transformation génétique

Afin de vérifier que les racines néoformées sont des chevelus racinaires trois méthodes peuvent être utilisées :

- *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).

- *Méthode biochimique* : Giri *et al.* (2001) et Kovalenko et Maliuta (2003) ont confirmé le caractère transgénique des chevelus racinaires par une analyse des opines. En effet, la synthèse des opines ne s'exprime que dans les cellules végétales transformées (Lambert *et al.*, 1988).
- *Méthodes phénotypiques* : la vérification de la transformation génétique peut être faite par des critères phénotypiques telles que : La croissance plagiotrope (Giri et Narasu, 2000 ; Kovalenko et Maliuta, 2003), la vitesse de croissance qui est plus importante que celle des racines normales cultivées dans les mêmes conditions (Tepfer, 1982 ; Guillon *et al.*, 2006) et la ramification latérale avec une fréquence élevée (Flores et Medina-Bolivar, 1995 ; Woo *et al.*, 2004).

L'expérimentation a été réalisée à l'Institut National de Recherche Forestière (INRF) aux laboratoires des cultures *in vitro* et de Pathologie forestière. Afin d'étudier l'induction de chevelus racinaires chez *Z. album*, quatre réponses seront considérées :

- le taux de réactivité : exprimé en pourcentage du nombre d'explants ayant formé un cal,
- le taux d'induction : exprimé en pourcentage du nombre d'explants ayant formé au moins une racine,
- le nombre moyen de racines par explant,
- le temps moyen d'apparition de la première racine.

1. Matériel végétal

1.1. Origine

Le matériel végétal de départ utilisé est constitué de graines de *Z. album* récolté à maturité dans l'Ahaggar (Sahara central) en avril 2014.

1.2. Méthode d'obtention du matériel végétal destiné à l'infection

1.2.1. Désinfection des graines

Les graines sont désinfectées par un passage dans l'éthanol à 96° pendant 20 secondes et un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 12° pendant 10 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérilisée et un séchage sur du papier filtre stérilisé.

1.2.2. Vitrosemis

Une fois stérilisées, les graines sont mises à germer. Elles sont ensemencées dans des tubes à essai contenant environ 20 ml de milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) (Tableau 1) additionné de 7 g/l d'agar et 20 g/l de sucre et ajusté à un pH 5,8 puis placées dans la 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.

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

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

2. Souche bactérienne

2.1. Origine et description de la souche A₄

La souche A₄ 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 segments, le T_L-DNA et le T_R-DNA. Le T_L-DNA (left DNA) comporte les gènes *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD* qui différencient les cellules en racines sous l'influence d'auxines endogènes. Le T_R-DNA (right DNA) porte les gènes de synthèse d'auxine (Lambert *et al.*, 1988 ; Tao et Li, 2006).

2.2. Méthode de préparation des suspensions bactériennes

La souche A₄ est conservée à -4°C à l'obscurité dans un milieu solide YEM (Amdoun *et al.*, 2009 ; Amdoun *et al.*, 2010): Yeast Extrait Mannitol (Tableau 2).

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

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

2.2.1. Activation de la bactérie A₄

Selon le protocole de Amdoun (2010), l'activation de la souche conservée à l'état congelé consiste à l'étaler sur milieu YEM solide puis mise en incubation à l'obscurité à une température de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 heures.

2.2.2. Mise en suspension.

Les bactéries obtenues après activation sont remises en suspension dans le milieu YEM liquide (figure 4) et laissées en incubation à 27°C sur agitateur (à 90 rpm) pendant 24 h à l'obscurité (Amdoun, 2010).

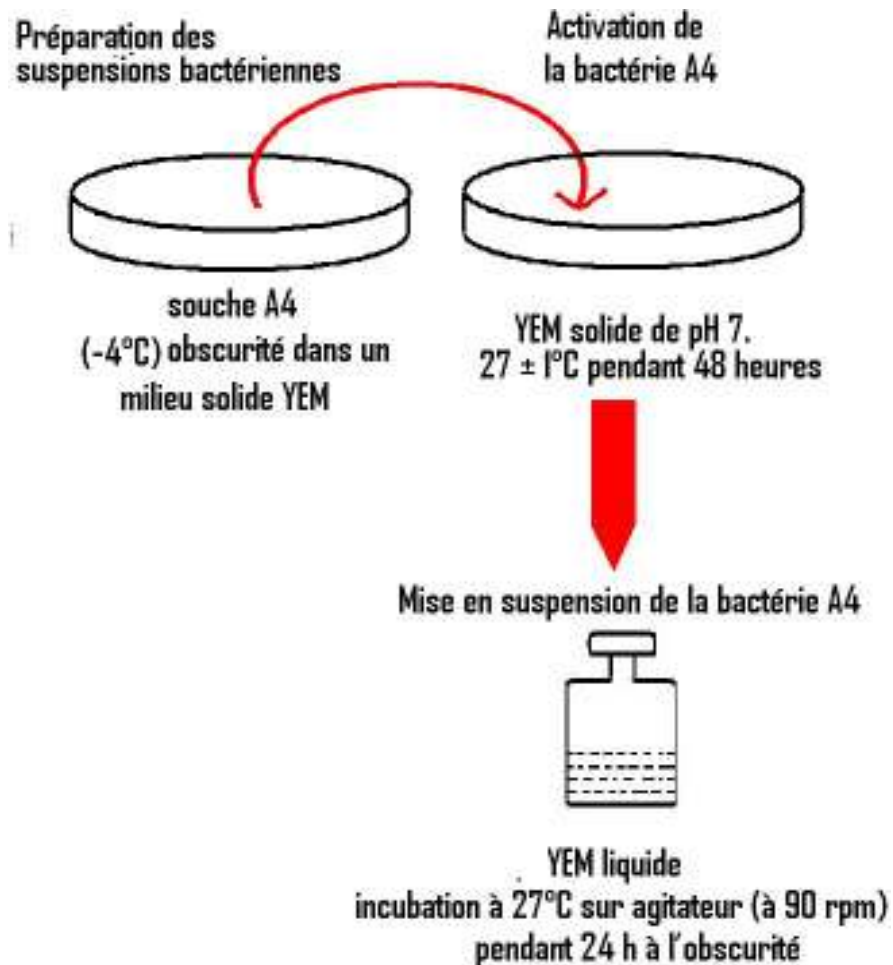


Figure 4. Méthode de préparation des suspensions bactériennes

3. Méthode de l'infection et de co-culture plante-bactérie

3.1. Etude de l'effet de l'acétosyringone et du glucose sur l'induction des chevelus racinaires.

L'infection se fait par simple dépôt à l'aide d'une seringue contenant la suspension bactérienne au niveau des explants de tiges (de 0,5 cm de long).

Pour induire les chevelus racinaires, 11 expériences de différentes combinaisons à savoir : 1 souche bactérienne x 5 concentrations d'acétosyringone x 5 concentrations de glucose sont réalisées selon le plan d'expérience *Central Composit Design* (section 7).

Les concentrations (niveau) de l'acétosyringone utilisées sont : 1,3 - 5 - 30 - 55 et 59 μM . Pour le glucose, les différents niveaux sont : 8,5 - 10 - 20 - 30 et 31,5 g/l.

3.2. Co-culture plante-bactérie

Les fragments de tiges de 4 à 5 mm de hauteur sont prélevés sur les vitrosemis de *Z. album* âgés de 8 semaines. Ils sont ensuite déposés, selon une polarité inversée, à raison de 5 explants par boîte de Pétri, sur milieu solide MS auquel on a additionné 0,25 g/l céfotaxime (antibiotique) afin d'éliminer la bactérie (Amdoun, 2010).

La co-culture est réalisée à l'obscurité à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

4. Isolement des racines induites

Les racines néoformées qui apparaissent sur le lieu d'infection sont excisées lorsqu'elles atteignent environ 2 cm de longueur (figure 5), puis repiquées sur le milieu MS contenant de moins en moins de céfotaxime jusqu'à élimination de la bactérie. Chaque racine isolée peut être considérée comme lignée unique (Tikhomiroff, 2001, Amdoun *et al.*, 2006).

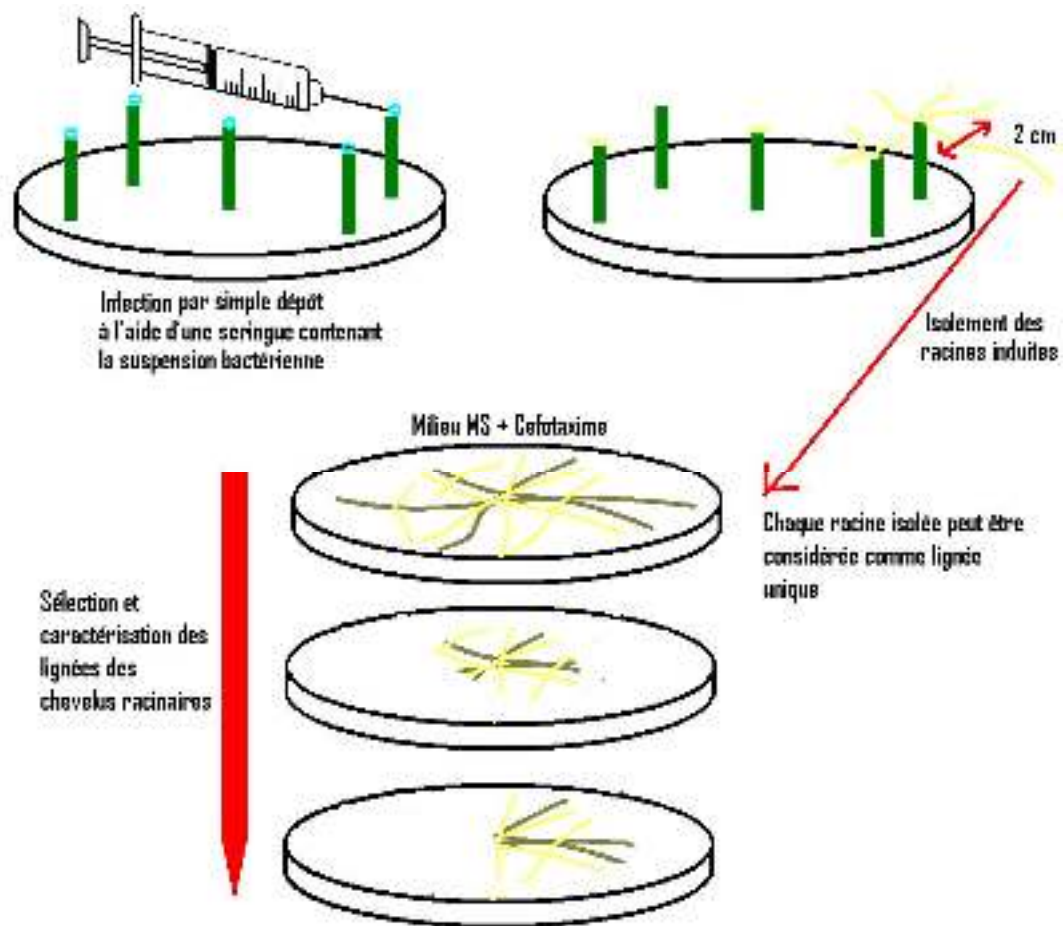


Figure 5. Méthode de l'infection et de co-culture plante-bactérie

5. Sélection et caractérisation des lignées des chevelus racinaires

Les racines qui présentent une forte croissance sont retenues, alors que celles qui présentent une faible croissance sont systématiquement éliminées (Vallet, 1996).

6. Confirmation de la transformation

Deux critères phénotypiques : la croissance plagiotrope et la vitesse de croissance, ont été retenus pour la vérification de la transformation génétique.

7. Plan d'expérience et traitement statistiques

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

$$Y = f(X_i) \quad (1)$$

Où Y est la réponse ($Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} et Y_{NMRE} .) et X_i sont les variables ou les facteurs (acétosyringone et glucose).

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 étudiées (Goupy, 2006).

Espace expérimental : Dans notre étude, on vise à modéliser l'induction de chevelus racinaires (exprimée par 4 réponses) en fonction des variations de l'acétosyringone (facteur 1, noté X_1) et du glucose (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 6). 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 (glucose) est représenté, lui aussi, par un axe gradué et orienté. Il est disposé orthogonalement au premier. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace appelé l'espace expérimental.

Les niveaux de l'acétosyringone (X_1) et les niveaux du glucose (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).



Figure 6. Exemple de domaine de variation du facteur 1 (X_1) : Acétosyringone.

Modélisation mathématique : Pour les modèles mathématiques ($Y_{Réac.}$; $Y_{Ind.}$; $Y_{Temps.}$; $Y_{NMRE.}$) qui relie l'induction des chevelus racinaires aux variations de l'acétosyringone et du glucose, on ajuste les coefficients d'une équation polynomiale qui permettra de calculer, grâce à la méthode des moindres carrés, toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences (Goupy, 2006).

L'ajustement des coefficients se fera sur la base de données obtenue 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 Composite Design, CCD*).

Le CCD a été décrit par Box et Wilson dans les années 1950. Ce plan 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 7) : Chaque point (E1 à E11) correspond à une expérience. Les points E1 à E4 constituent le plan factoriel 2^k ($k=2$). Les points E5 à E8 constituent le plan en étoile. Les points E9 à E11 constituent les expériences effectuées au centre du domaine d'étude. Ainsi, l'application du CCD reviendrait à réaliser 11 expériences combinant les deux facteurs, dont trois expériences sont situées au centre du plan (E9-11).

Ce plan d'expérience permettra l'étude des effets simples et d'interactions de l'acétosyringone et du glucose sur les réponses ($Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} ; Y_{NMRE} .) à l'induction des chevelus racinaires chez *Z. album* par la souche A₄.

Au total, 5 niveaux (concentrations) sont retenus pour chacun des deux facteurs considérés. Les niveaux bas et hauts 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 (2), où X_i est la variable indépendante en valeur codée, W_i est la variable indépendante en valeur réelle, W_0 ($W_0 = 30$ et 20 pour respectivement l'acétosyringone et le glucose) est la variable indépendante en valeur réelle au centre et ΔW_i est le pas ($\Delta W_i = 25$ pour l'acétosyringone et 10 pour le glucose).

$$X_i = \frac{(W_i - W_0)}{\Delta W_i} \quad (2)$$

Tableau 3. Valeurs codées et réelles des concentrations de l'acétosyringone et du glucose.

Facteurs étudiés	$-\alpha = -1,147$	-1	0	$+1$	$+\alpha = +1,147$
Acétosyringone (μM)	1,3	5	30	55	58,7
Glucose (g/l)	8,5	10	20	30	31,5

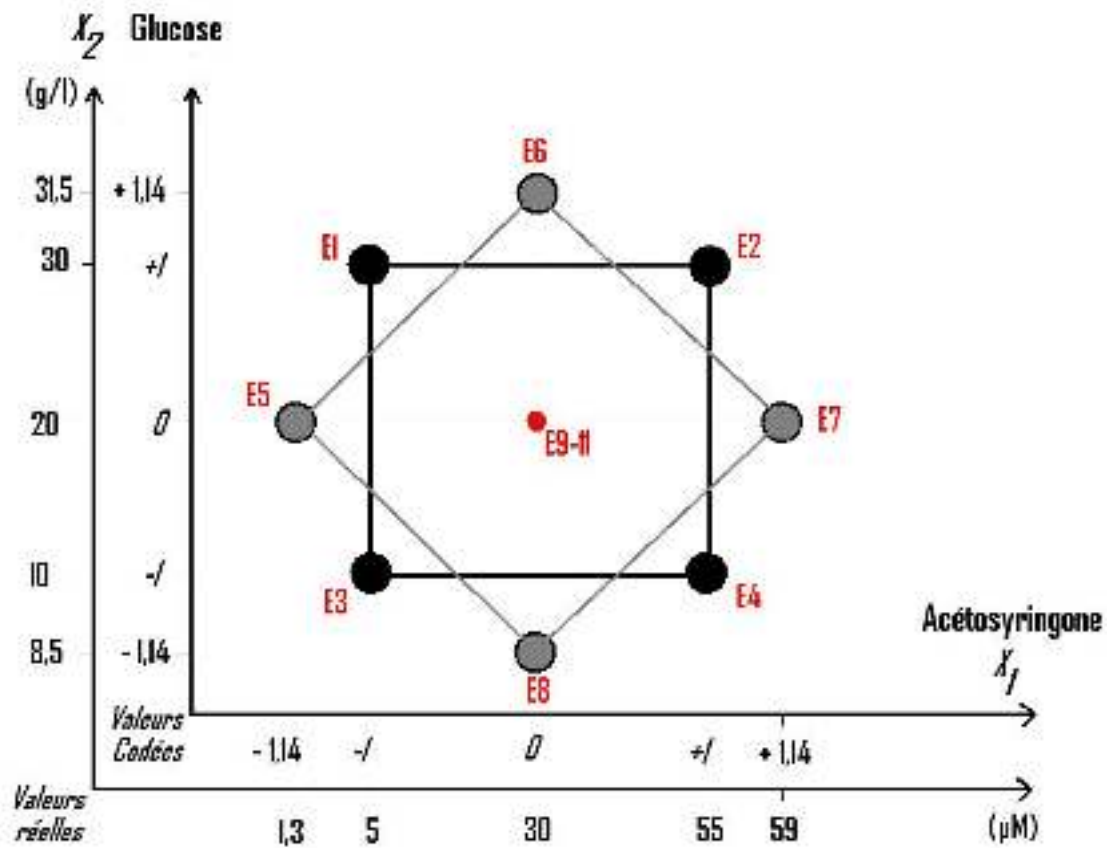


Figure 7. Plan d'expérience CCD et niveaux de chacun des deux facteurs (X_1 : Acétosyringone ; X_2 : glucose ; $\pm\alpha = \pm 1,147$.)

Les données recueillies après l'application du CCD serviront à écrire les modèles de régression quadratique (équation 3) traduisant les effets de l'acétosyringone et du glucose sur les réponses mesurées ($Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} ; Y_{NMRE}) :

$$Y = a_0 + \sum_{j=1}^k a_j X_j + \sum_{j=1}^k a_{jj} X_j^2 + \sum_{j < l} \sum_{l=2}^k a_{jl} X_j X_l + \varepsilon \quad (3)$$

où Y est la réponse ($Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} ; Y_{NMRE}), 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 (l'acétosyringone et glucose) et ε est l'erreur du modèle (Goupy et Creighton, 2006).

Le calcul des concentrations qui optimisent les réponses individuellement est réalisé à partir de chaque modèle obtenu. L'optimum local correspond aux valeurs positives des variables où les premières dérivées ($\delta Y_i / X_1$; $\delta Y_i / X_2$) du modèle s'annulent.

Les mesures statistiques d'ajustement des modèles ($Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} ; Y_{NMRE}) utilisées pour l'évaluation sont : le coefficient de détermination R^2 et l'erreur type. Des valeurs élevées de R^2 et des valeurs faibles de l'erreur indiquent une bonne précision des modèles.

Le graphique de Paréto sera également utilisé afin de discriminer les effets significatifs positifs et négatifs des facteurs sur les réponses étudiées (modèles).

8. Optimisation multicritère.

L'optimisation peut avoir comme objectifs de maximiser, de minimiser ou d'atteindre une valeur cible de la réponse. Donc en fonction de ces objectifs, différentes méthodes d'optimisation multicritère peuvent être utilisées dont la méthode de la désirabilité (Pasandideh et Niaki, 2006).

La fonction de désirabilité définie par Harrington (1965) puis par Derringer et Suich (1980) est l'une des approches les plus utilisées dans l'optimisation multicritères (Bourguignon et Massart, 1991 ; Guillaume et Guinchard., 1996 ; Dewé *et al.*, 2004 ; Jeong et Kim, 2009).

Elle est basée sur la transformation de toutes les réponses obtenues à partir de différentes échelles de mesure en une échelle unique sans dimension de désirabilité. Les valeurs des fonctions de désirabilité $d_i(Y_i)$ sont comprises entre 0 et 1 pour chaque réponse Y_i . La valeur 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse non désirable et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs étudiés (Derringer et Suich, 1980 ; Jeong et Kim, 2009).

La désirabilité globale D (*over all desirability*) est la moyenne géométrique des valeurs de désirabilité individuelle de chaque réponse $d_i(Y_i)$ calculée par l'équation (4) où n est le nombre de réponses (4 réponses dans notre cas : $Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} ; Y_{NMRE}).

Les solutions optimales (combinaison optimales entre l'acétosyringone et le glucose) sont celles qui maximisent D (Jeong et Kim, 2009).

$$D = \left(\prod_{i=1}^n d_i(Y_i) \right)^{1/n} \quad (4)$$

1. Obtention du matériel végétal destiné à l'infection

Au bout d'une semaine, nous avons enregistré un taux de germination d'environ 85 %. Les vitrosemis de huit (8) semaines sont utilisés pour prélever les explants de 5 à 6 mm d'épaisseur destinés à la transformation génétique (Figure 8).



Figure 8. Vitrosemis de huit (8) semaines destinés à la transformation génétique.

2. Effets de l'acétosyringone et du glucose sur l'induction des chevelus racinaires.

Les résultats obtenus après l'application du CCD sont résumés dans le tableau 4. Ces résultats ont été utilisés pour l'ajustement des modèles traduisant les réponses de *Z. album* à l'infection par la souche A_4 de *A. rhizogenes* en fonction de deux facteurs : l'acétosyringone et le glucose apportés à différentes concentrations.

Tableau 4. Résultats obtenus après l'application du CCD.

Expériences	Traitements				$Y_{Réac}$	Y_{Ind}	Y_{Temps}	Y_{NMRE}
	valeur codées		valeur réelles					
	Acéto.	Glu.	Acéto.	Glu.				
<i>E1</i>	-1	-1	5,0	10,0	90	6,0	12,5	4,0
<i>E2</i>	0	-1,147	30,0	8,5	75,9	10,0	12,6	2,2
<i>E3</i>	1	-1	55,0	10,0	58,0	9,7	13,6	2,3
<i>E4</i>	0	1,147	30,0	31,5	68,0	20,0	13,0	2,0
<i>E5</i>	1	1	55,0	30,0	76,0	10,0	13,0	4,8
<i>E6</i>	-1	1	5,0	30,0	88,0	12,0	13,2	3,3
<i>E7</i>	1,147	0	59,0	20,0	64,0	6,0	13,3	3,4
<i>E8</i>	-1,147	0	1,3	20,0	76,0	12,0	13,1	3,8
<i>E9</i>	0	0	30,0	20,0	64,0	12,8	13,2	3,4
<i>E10</i>	0	0	30,0	20,0	46,0	12,0	13,3	3,5
<i>E11</i>	0	0	30,0	20,0	58,0	12,8	13,3	3,6

Légendes : **Acéto :** Acétosyringone – **Glu :** Glucose – $Y_{Réac}$: Pourcentage de réactivité - Y_{Ind} : Pourcentage d'induction- Y_{Temps} : Temps moyen d'apparition de la première racine - Y_{NMRE} : Nombre moyen de racine par explant.

2.1. Le taux de réactivité ($Y_{Réac}$).

Les taux de réactivité (formation de cal) observés varient de 46% à 90% suivant les expériences réalisées (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). Pour le modèle $Y_{Réac}$ (équation 5), le R^2 est de 0,83, ceci suggère que 83% de la réactivité est attribuée aux effets de l'acétosyringone et du glucose, et que 17% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle.

Cependant, l'erreur-type d'estimation est élevée, elle est de 7,9. Néanmoins, le modèle $Y_{Réac}$ explique la quasi-totalité de la variabilité, il est donc globalement prédictif.

$$Y_{Réac} = 56,1 - 8,7X_1 + 1,0X_2 + 10,3X_1^2 + 5,0X_1X_2 + 11,8X_2^2 \quad (5)$$

Le classement des effets du modèle $Y_{Réac}$ selon le graphique de Pareto (Figure 9) montre que l'effet linéaire négatif de l'acétosyringone est statistiquement le plus influent sur le taux de réactivité. Il est suivi dans la même mesure par l'effet quadratique du glucose qui possède statistiquement un effet positif sur le taux de réactivité. Plus la concentration du glucose augmente dans la suspension bactérienne, plus le taux de réactivité est significativement important.

L'optimisation individuelle utilisant les dérivées du modèle $Y_{Réac}$ donne comme solution optimale - 1,147 pour l'acétosyringone et -1,147 pour le glucose, ce qui est équivalent à 1,3 μ M et 8,5 g/l respectivement. Ces deux valeurs permettent l'obtention de 100% de réactivité.

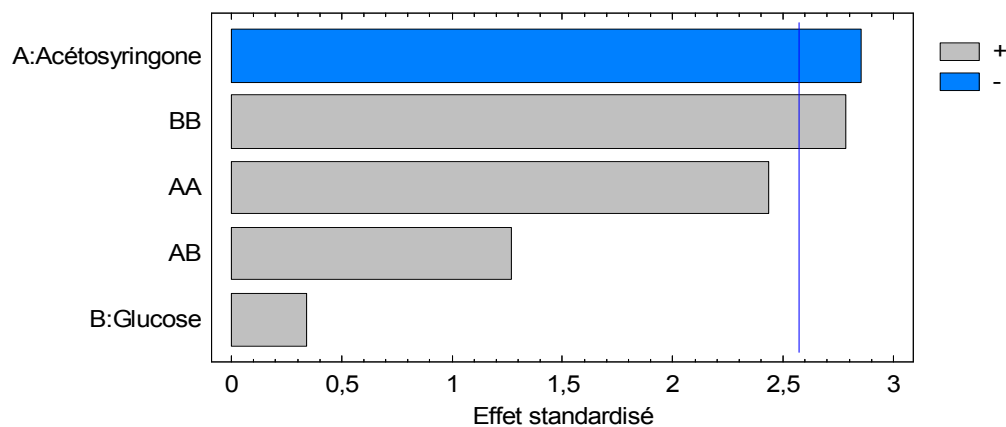


Figure 9. Graphique de Pareto standardisé pour $Y_{Réac}$.
(la barre verticale représente le seuil de signification au risque 95%).

La figure 10 présente quelques explants de *Z. album* ayant formé un cal suite à l'infection par la souche A₄ de *A. rhizogenes*.

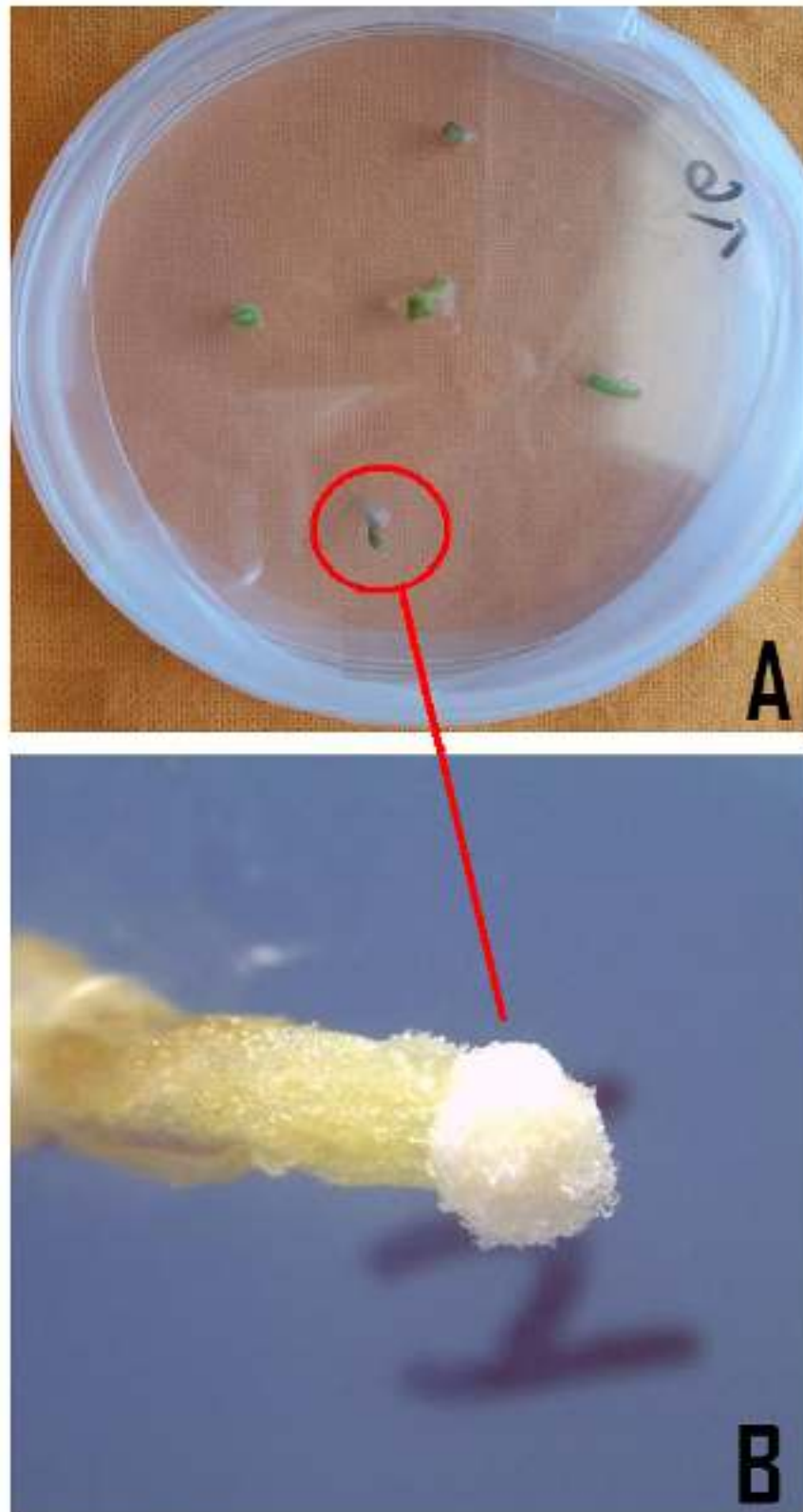


Figure 10. Explants de *Z. album* ayant formé un cal suite à l'infection par la souche A₄ de *A. rhizogenes* (A) ; cal (Gr : 10 x 12) (B).

2.2. Le Taux d'induction des racines (Y_{Ind}).

Les taux d'induction (formation de racine) varient de 6% pour la plus faible valeur à 20% pour le meilleur taux observé (Tableau 4). Bien que l'erreur-type d'estimation du modèle Y_{Ind} (équation 6) soit élevée (2,6), ce dernier explique 77% de la variabilité globale selon son R^2 (0,769). Le modèle est globalement bien ajusté aux données expérimentales.

$$Y_{Ind} = 13,0 - 0,8X_1 + 2,7X_2 - 3,7X_1^2 - 1,4X_1X_2 + 0,8X_2^2 \quad (6)$$

D'après le graphique de Pareto (Figure 11), l'effet quadratique de l'acétosyringone est négativement significatif. Donc, l'acétosyringone inhibe l'induction des racines. Le glucose a une influence linéaire positive sur l'induction des racines et son importance est aussi grande que l'effet quadratique de l'acétosyringone.

L'optimisation individuelle de Y_{Ind} donne - 0,32 soit 22 μ M pour l'acétosyringone et 1,147 pour le glucose soit 31,5 g/l, ce qui permet d'avoir 17,5% d'induction de chevelus racinaires.

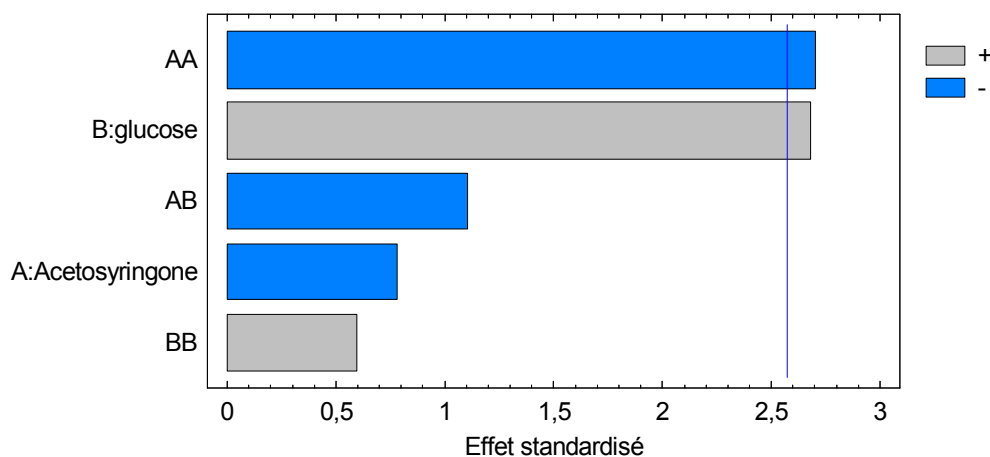


Figure 11. Graphique de Pareto standardisé pour Y_{Ind} .

(la barre verticale représente le seuil de signification au risque 95%).

La figure 12 présente des explants de *Z. album* ayant formé des chevelus racinaires au site de l'infection par la souche A_4 de *A. rhizogenes*.

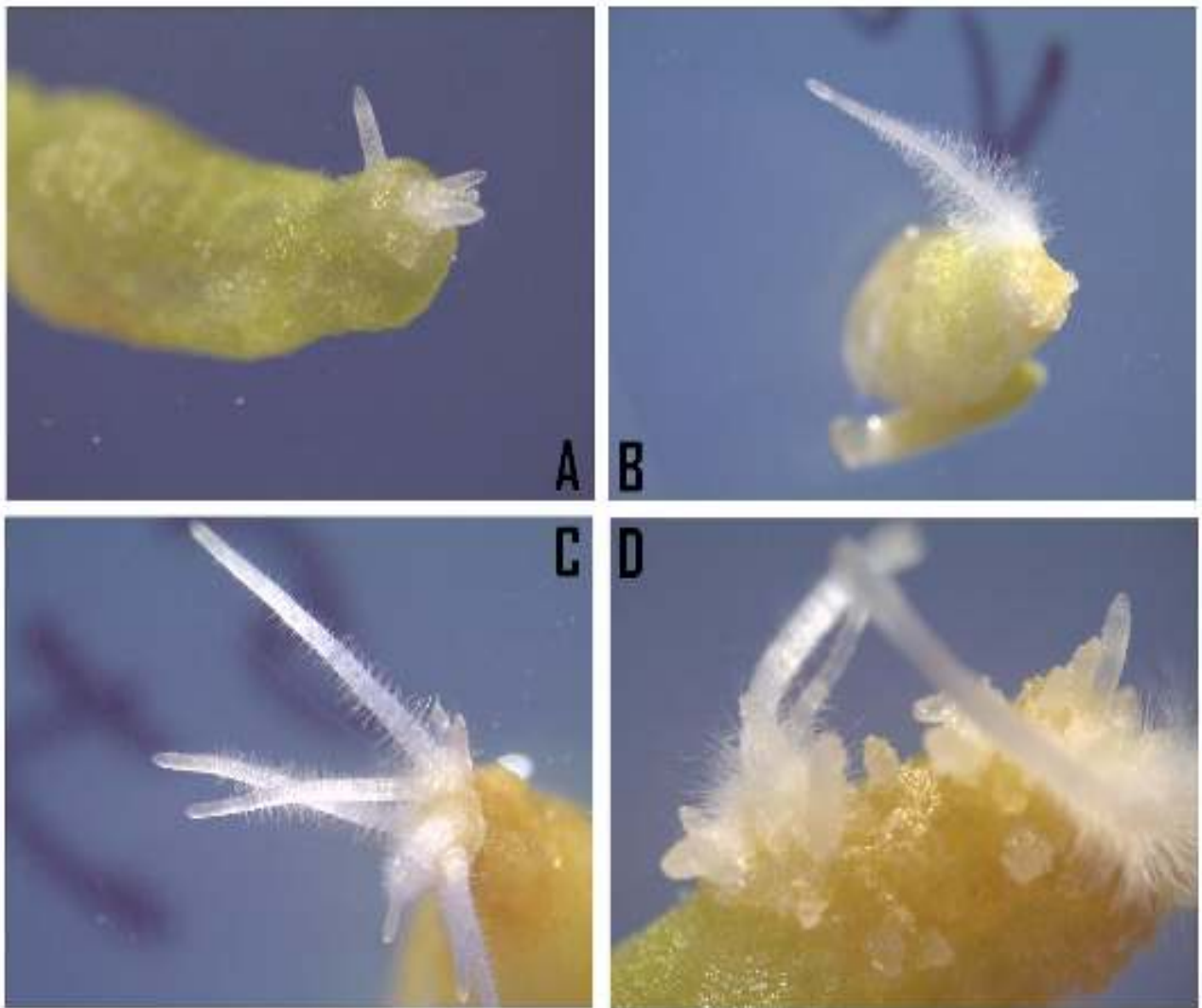


Figure 12. Induction de chevelus racinaires sur les explants de *Z. album* suite à l'infection par la souche A₄ d'*A. rhizogenes* :
A : initiation des chevelus racinaires - **B** : élongation - **C** : croissance et prolifération de chevelus racinaires - **D** : chevelus racinaires (Gr : Gr : 10 x 12).

2.3. Temps moyen d'apparition de la première racine (Y_{Temps})

Le tableau 4 montre une légère variation entre les temps d'induction les plus précoces et les plus tardifs. En effet, le temps d'apparition des racines varie de 12,5 à 13,6 jours. Bien que l'erreur type d'estimation est légèrement élevée (0,2), le modèle Y_{Temps} (équation 7) explique 88% de la variabilité globale, il est donc globalement prédictif.

$$Y_{Temps} = 13,2 + 0,2X_1 + 0,1X_2 + 0,05X_1^2 - 0,3X_1X_2 - 0,3X_2^2 \quad (7)$$

Le graphique de Pareto (Figure 13) montre que l'interaction des effets de l'acétosyringone et du glucose a un effet positif sur la précocité d'apparition des racines. Il en est de même pour l'effet quadratique du glucose qui améliore le temps d'apparition des racines. L'effet linéaire de l'acétosyringone retarde le temps d'apparition des racines.

L'optimisation individuelle de Y_{Ind} donne 1,3 μM (-1,147 en valeur codée) pour l'acétosyringone et 8,5 g/l (-1,147) pour le glucose, ce qui permet d'induire les chevelus racinaires à 13,6 jours.

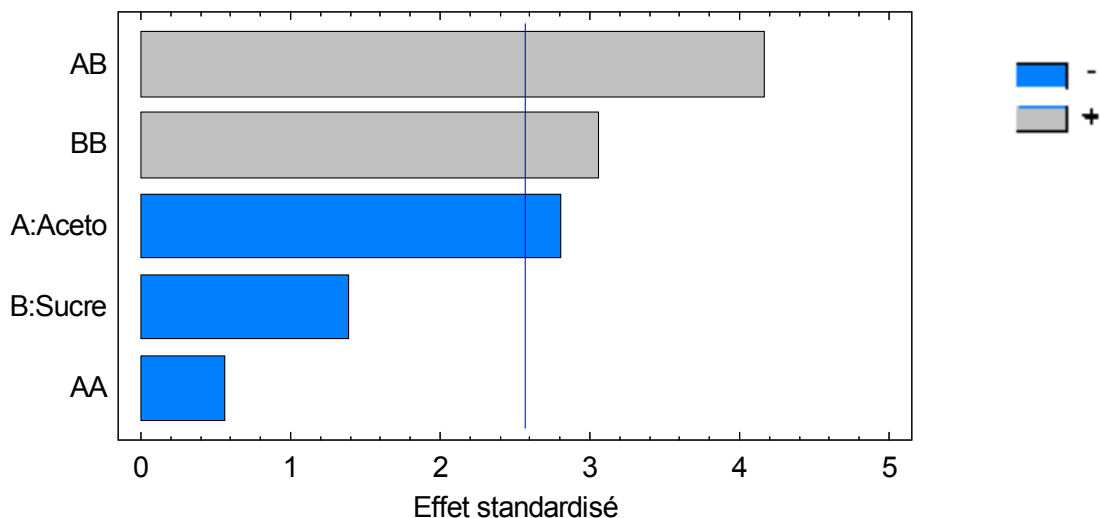


Figure 13. Graphique de Pareto standardisé pour Y_{Temps} .
(la barre verticale représente le seuil de signification au risque 95%).

2.4 Le nombre moyen de racines par explant (Y_{NMRE}).

Le nombre moyen de racines par explant varie de 2 à 4,8 racines/explant. La valeur du coefficient de détermination R^2 est de 0,75, donc le modèle Y_{NMRE} (équation 8) explique 75% de la variabilité globale. Le modèle est donc bien ajusté aux données expérimentales bien qu'on note une valeur élevée de l'erreur type qui est de 0,6.

$$Y_{NMRE} = 3,3 - 0,1X_1 + 0,2X_2 + 0,6X_1^2 + 0,8X_1X_2 - 0,6X_2^2 \quad (8)$$

D'après le graphique de Pareto (Figure 14), seul l'effet linéaire d'interaction du couple [acétosyringone- glucose] a un effet positif sur le nombre moyen de racines par explant.

Les concentrations optimales qui maximisent individuellement Y_{NMRE} (4,5 racines/explant) correspondent à 1,147 pour l'acétosyringone et 1,02 pour le glucose en valeurs codées, ce qui correspond en valeurs réelles à 59 μM et 30,21 g/l respectivement.

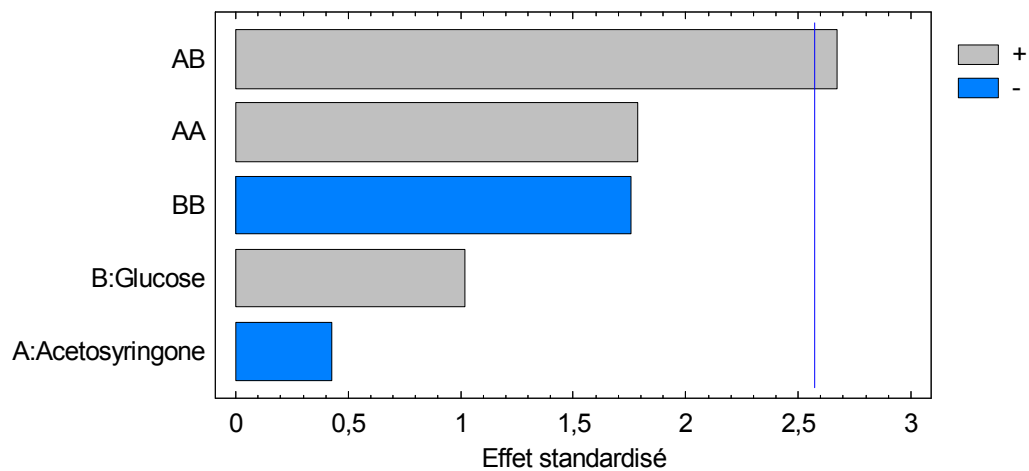


Figure 14. Graphique de Pareto standardisé pour Y_{NMRE} .
(la barre verticale représente le seuil de signification au risque 95%).

3. Optimisation multicritère.

Le calcul des concentrations optimales de l'acétosyringone et du glucose pour optimiser chaque réponse individuellement sont variables. Pour trouver un compromis, la fonction de désirabilité D a été appliquée pour déterminer la combinaison [acétosyringone – glucose] qui optimise de façon simultanée plusieurs réponses à savoir : $Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} ; Y_{NMRE} .

Les solutions (concentrations de l'acétosyringone et du glucose) qui maximisent D (optimum $D = 0,49$, Figure 15) sont : - 0,750 pour l'acétosyringone et -1,147 pour le glucose équivalent à 11,25 μM et 8,5 g/l respectivement. Ces concentrations permettent d'obtenir sur 100 explants infectés : 87% de réactivité ($Y_{Réac}$), 8% du taux d'induction (Y_{Ind}); 12 jours pour le temps d'apparition des racines (Y_{Temps}) et 3 racines environ par explant (Y_{NMRE}).

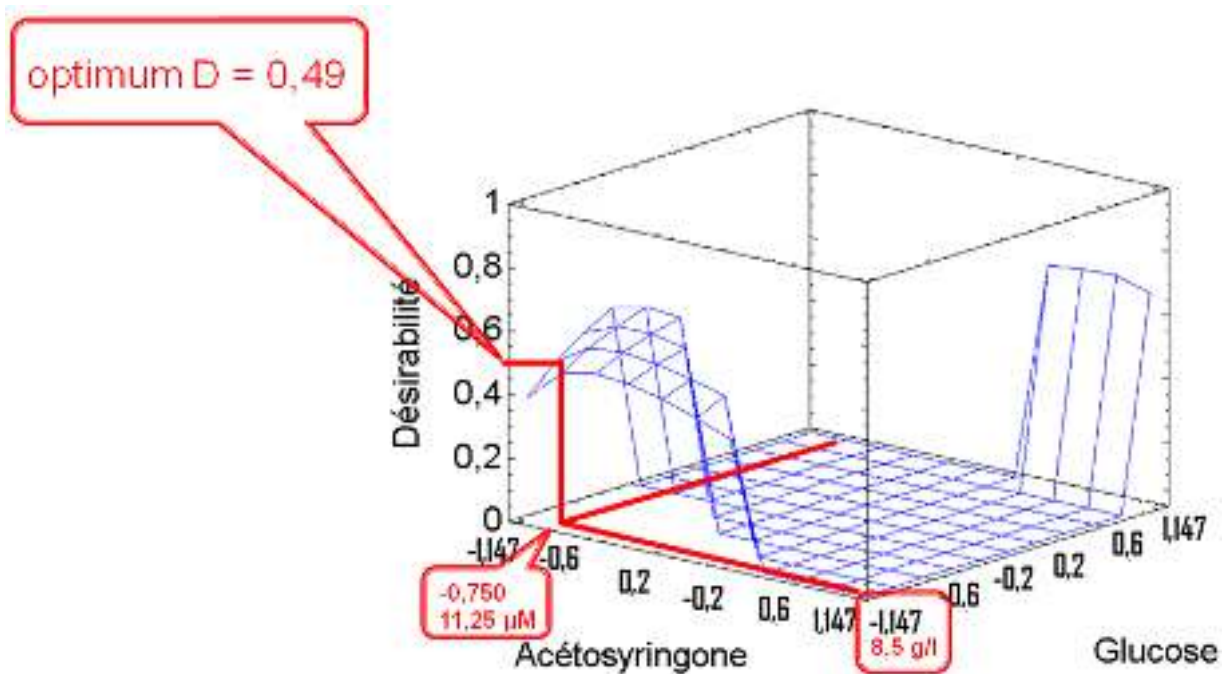


Figure 15. Surface de réponse des valeurs de désirabilité globale (D) en fonction de la concentration de l'acétosyringone et du glucose.

Les concentrations optimales de l'acétosyringone et du glucose apportées à la suspension bactérienne de la souche *A₄*, nous permettent d'obtenir, sur 100 explants infectés, un rendement estimé à 40 lignées de chevelus racinaires chez *Z. album* ; des lignées (Figure 16) qu'il faudra par la suite caractériser et sélectionner afin de retenir les meilleures pour la production des métabolites secondaires d'intérêt.

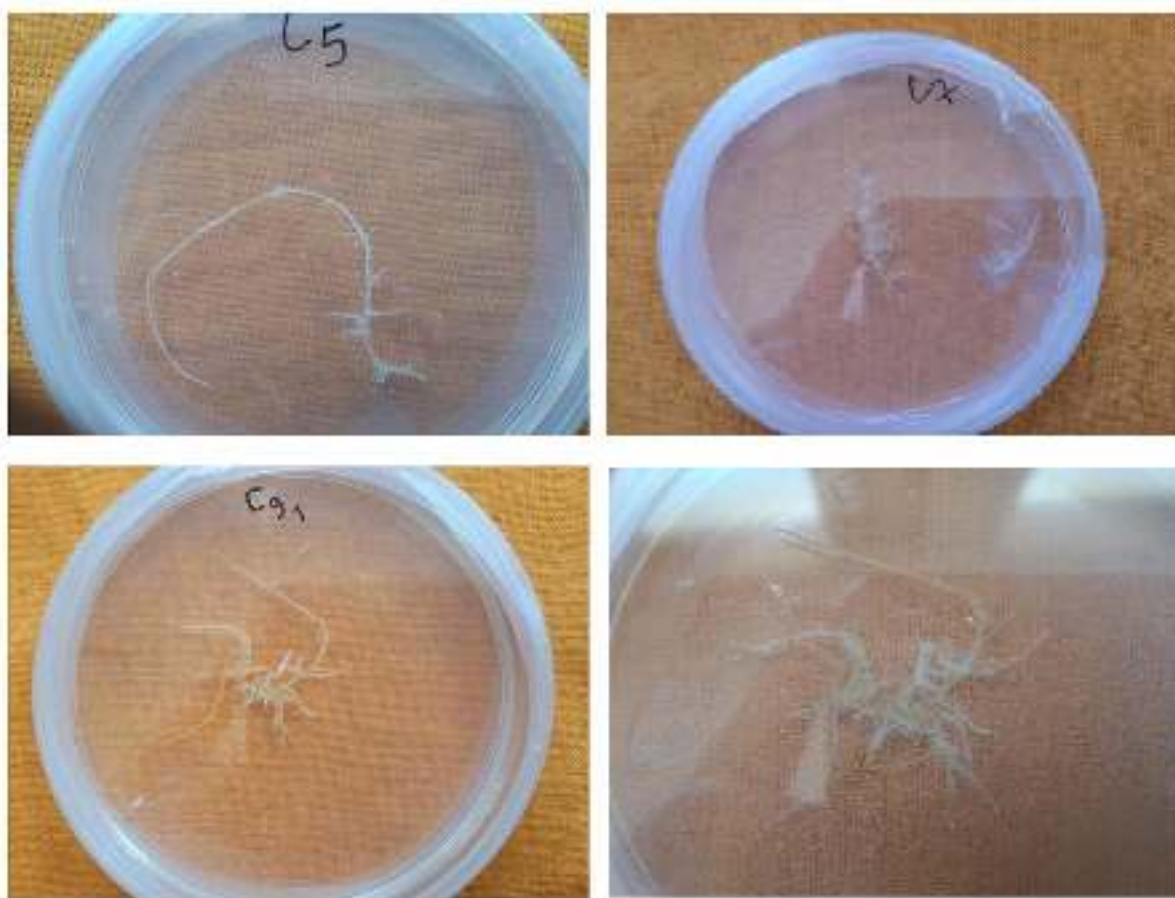


Figure 16. Quelques lignées de chevelus racinaires obtenues.

4. Discussion

Nos résultats montrent que L'acétylsyringone inhibe la formation de cal. Ce résultat pourrait être attribué à l'espèce végétale elle-même. En effet, certaines plantes ne nécessitent pas la suractivation des gènes *vir* de *A. rhizogenes* pour qu'elles réagissent à l'infection. Kovalenko et Maliuta (2003) ont observé la formation de chevelus racinaires chez les explants de *Glycyrrhiza sp* infectés par la souche 8196 de *A. rhizogenes* sans l'apport d'acétylsyringone. Certaines plantes dites récalcitrantes peuvent être transformées en suractivant les gènes *vir* de la bactérie par des signaux chimiques tel que l'acétylsyringone ou bien par la culture de l'*Agrobacterium* dans un milieu ayant contenu des tissus blessés de la plante à infecter (Tao et Li, 2006). Le *Zygophyllum album* est une espèce qui répond à l'infection par *A. rhizogenes*, elle n'est donc pas récalcitrante. Toutefois, l'apport du glucose améliore le taux de réactivité (formation de cal) chez le *Z. album*. La transformation d'*Opium poppy* et de *California poppy* par la souche R1000 donne presque le même taux de réactivité (formation de cal) ; 92% et 93% respectivement (Park et Fachini, 2000). La même observation est faite pour la souche R1200rolD qui donne un taux de réactivité de 91% pour *Opium poppy* et 92% pour *California poppy*. Pour notre essai, le meilleur taux observé est de 90% chez *Z. album* infecté par la souche A₄ de *A. rhizogenes*.

Pour notre essai, le meilleur taux d'induction des chevelus racinaires est de 20%. Tao et Li (2006), rapportent que la concentration de l'acétylsyringone affecte plutôt le taux d'induction de chevelus racinaires avec un optimum à 30 µM qui permet d'avoir un taux d'induction de 80% contre 25% pour les explants infectés avec la bactérie sans acétylsyringone. Cependant dans notre cas, l'acétylsyringone bloque l'induction des chevelus racinaires chez *Z. album* alors que le glucose l'améliore. Ce résultat confirme que cette espèce n'est pas récalcitrante à la transformation génétique par la souche A₄. Plusieurs espèces infectées par la souche A₄ présentent des taux d'induction différents (formation de racines) : il est de 70 % pour *Valeriana wallichii* (Banerjee *et al.*, 1998), 98% pour *Nicotiana*, 80% pour *Datura duboisia*, 34% pour *D. metel* (Moyano *et al.*,

1999) et 55 % pour *Torenia fornieri* (Tao et Li, 2006). Amdoun *et al.* (2006) ont trouvé un taux d'induction de 20% pour les tiges de *Datura innoxia* et 22% pour le *Datura stramonium*.

Les chevelus racinaires apparaissent 10 à 25 jours après infection de *Datura innoxia* par *A. rhizogenes* (Vallet, 1996), alors qu'il faut 6 semaines pour *Datura metel* et *D. Duboisia* (Moyano *et al.*, 1999). Chez les explants de *Vitis vinifera*, les chevelus racinaires apparaissent 8 jours après l'infection par la souche *A₄* (Martins *et al.*, 2003). Pour *Z. album*, le meilleur temps d'apparition des racines observé dans notre essai est 12,5 jours. Cette durée est retardée par un apport d'acétosyringone mais activée par le glucose.

Un effet synergique améliorant l'activation des gènes *vir* de *A. rhizogenes* a été rapporté par plusieurs auteurs. Selon Cangelosi *et al.* (1990) et Wise *et al.* (2005), en présence d'une concentration de 2,5µM d'acétosyringone, l'expression de gène *virB* chez l'*Agrobacterium* est augmentée de 5 à 10 fois. Ils rapportent également que l'addition de certains sucres, tel que le fructose provoque une augmentation de l'induction de ces gènes de 60 à 200 fois, et que cet apport est essentiel pour l'infection de certaines plantes. Ces auteurs indiquent que les monosaccharides en interaction avec les composés phénoliques, activent les gènes de virulence de l'*Agrobacterium* par la synthèse de différents régulateurs telles que les protéines chromosomique ChevE et périplasmique VirA. Ankenbauer et Nester (1990), notent que l'arabinose, le fructose, le galactose, le glucose et le xylose stimulent considérablement l'induction des gènes *vir* en présence d'acétosyringone et que ces sucres affectent fortement l'expression des gènes *vir* quand l'acétosyringone est présent en faible concentration. Schimoda *et al.* (1993) signalent que les monosaccharides agissent de telle façon à augmenter l'induction des gènes *vir* par l'acétosyringone et que c'est le complexe sucre-ChevE qui interfère avec VirA pour activer les gènes *vir*. Orlikowska *et al.* (1995) rapportent que des composés phénoliques comme l'acétosyringone et des sucres tels que le

glucose et l'acide glucuronique sont impliqués dans l'expression des gènes *virA*, *virG* et *ChvE* et augmentent l'excision de l'ADN-T. Les résultats décrits par ces auteurs pourraient expliquer nos observations concernant l'effet synergique de l'acétosyringone et du glucose qui améliore la précocité d'apparition des chevelus racinaires et le nombre de racine par explant. Pour notre étude, le meilleur nombre de racines obtenu est de 4,8 racines/explant chez *Z. album*. Ce nombre est acceptable en comparaison avec d'autres espèces. En effet, Chez *Opium poppy* le nombre de racines induites par explant est de 4,1 racines (Park et Fachini, 2000) alors qu'il ne dépasse pas 3 racines par explant chez *Datura innoxia* et *D. stramonium* (Amdoun *et al.*, 2006).

Conclusion

Notre travail a visé l'étude de la sensibilité de *Z. album* à la souche A_4 de *A. rhizogenes* en vue d'induire les chevelus racinaires (hairy root) en fonction de deux facteurs : l'acétosyringone et le glucose.

Nos résultats montrent que le glucose ajouté à la suspension bactérienne d' A_4 , améliore la formation de cals, de racines et la précocité d'apparition des chevelus racinaires, alors que l'acétosyringone inhibe ces paramètres. L'interaction synergique de ces deux facteurs permet d'améliorer la précocité d'apparition des chevelus racinaires et leur nombre ce qui constituent les résultats les plus intéressants pour la production de chevelus racinaires chez *Z. album*. En effet, l'obtention d'un grand nombre de lignées racinaires de départ est un fait recherché dans un programme de sélection. Il permet l'augmentation de la probabilité d'avoir des lignées performantes en termes de biomasse et de biosynthèse de métabolites secondaires.

Zygophyllum album est une espèce sensible (réactive) à l'induction de chevelus racinaires par la souche A_4 et peut être utilisée pour la production de ces derniers. Le travail futur devrait étudier la sélection et la caractérisation des lignées de chevelus racinaires de *Z. album* en vue de les utiliser pour une production performante par voie biotechnologique des métabolites secondaires d'intérêt médicinal qu'elle présente.

Références bibliographique

Abid M., (1995). Transformation de *Cichorium intybus* L. Etude de l'expression du gène *uidA* dans les plantes transgéniques. Thèse Doct., Univ. Lille, 208p.

Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Mark Ash., Assaf-Ducrocq C., E. Gontier., (2010). Optimisation of the culture medium composition to improve the production of hyoscyamine in elicited *Datura stramonium* L. Hairy roots using the response surface methodology (RSM). *Int.J.Mol.Sci.*11 :4726-4740.

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

Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Zarouri B., Boutoumi Y. et 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., 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., 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. *Journal of Bacteriology.* 172 (11): 6442 - 6446.

Ayad R., (2010). Recherche et Détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce : *Zygophyllum cornutum* (Zygophyllaceae), Magister, Univ. Mantouri Constantine, 124p.

Banerjee S., Rahman L., Uniyal G.C., Ahuja P.S., (1998). Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Science. 131 : 203-208.

Barakat Makhzoum A., (2007). Mise en place d'un système de transfert de gènes et de régénération de plantes *in vitro* pour l'étude de la régulation du métabolisme des alcaloïdes chez *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Application au promoteur de la déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase. Thèse Doct., Univ. Tours 137p.

Berenbaum M.R., (1995). The chemistry of defense : theory and practice. biotechnological economic aspects. *Option méditerranées – série séminaire. 14 : 59-74.*

Boughalleb F., Denden M., Neffati M., (2012). Photosynthetic and Antioxidant Responses of the Xero-Halophyte *Zygophyllum album* (L.) to Salt Stress. Research Journal of Biological Sciences Volume 7 |278-284 pp.

Bourguignon B., Massart D.L., (1991). Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function. *J. Chromatogr. 586: 11 – 20.*

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. 67p.

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

Cangelosi G.A., Ankebauer R.G., Nester EW., (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. Genetics. Vol.87. 6708-6712.

Chilton M.D., Drummond M.H., Merio D.J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M.P., Nester E.W., (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of Crown Gall tumorigenesis. Cell 11:263-271.

Chopra C., Abrol B.K., Handa K.L., (1960). Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. Drug Research Laboratory, Jammu (Inde). Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture Unesco. Paris-7e Imprimeries Oberthur, Rennes. 95p.

Davet P., (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA. Paris. 383p.

David C., Chilton M.D., Tempé J., (1984). Conversation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. *Biotech.* **2**, 73-76.

Derringer G., Suich R., (1980). Simultaneous optimization of several response variables.

Dewé W., Marini R.D., Chiap P., Hubert J., (2004). Development of response models for optimising HPLC methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* **74**: 263 – 268.

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 Sciences.* **169** : 812-818.

Diouf D., (1996). La transformation génétique des *Casuarinaceae*: un outil pour l'étude moléculaire des symbioses actinorhiziennes. Thèse Doct. Univ. Paris VII-Denis Diderot. 127p.

El Ghouli 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 & 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.

Estruch J.J., Parets-Soler A., Schmülling T., Spena A., (1991). Cytosolic localization in transgenic plants of the rolC peptide from *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol. Biol.* **17**, 547-550.

Fahmy G.M., Ouf S.A., (1999). Significance of microclimate on phylloplane mycoflora of green and senescing leaves of *Zygophyllum album* L. Faculty of Science, University of Cairo, Giza, 12613, Egypt, *Journal of Arid Environments* (Impact Factor: 1.82). 03/1999; 41(3):257-276.

Feriani A., Ncir M., Saoudi M., El Feki A., Allagui M.S., (2014). Impact cytotoxique d'une administration chronique de la bifenthrine chez le rat pubère. Effets protecteurs du *Zygophyllum album*. Association Tunisienne de Physiologie et Bio-surveillance de l'Environnement 3ème Congrès International de l'ATP-BE (2014) 15-18 décembre 2014. Sousse. Tunisie.

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., 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.

Gelvin, S.B., (2003). "Improving plant genetic engineering by manipulating the host." *Trends in Biotechnology* 21(3): 95-98.

Ginzburg G., Toderich K.N., Mardonov B.K., Mahmudov M.M., (2003). Rangelands of the arid and semi-arid zones in Uzbekistan. CIRAD. 2003.

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 rhizogens* 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. 303 p.

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

Goupy J., Creighton L., (2006). Introduction aux plans d'expériences, Ed. Dunod.

Guillaume Y., Guinchard C., (1996). Method to study the separation of eight phydroxybenzoic esters by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*. 727 : 93 – 99.

Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati K. P., Rideau M., Gantet P., (2006). Hairy root reserch :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.

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

Jeong I.J., Kim K.J., (2009). An interactive desirability function method to multiresponse
Journal of Quality Technology. 12 (4): 214 – 219.

Karmarkar S.H., Keshavachandran R., Nazeem P.A., Girija D., (2001). Hairyroot induction in Adapathiyam *Holostemmaada kodienk* SCHUM. *Journal of Tropical Agriculture*. 39 :102-107.

Khaldi A., Meddah B., Moussaoui A., Benmehdi H., Gouri S., (2012). Phytochemical Screening and *in Vitro* Antifungal Effect of some *Plants Extracts of Asphodelus Tenutfolius Cavan* and *Zygophyllum Album L.* on Fungi Development *European Journal of Scientific Research* ISSN 1450-216X Vol.80 No.3 (2012), pp.31 1-321.

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.

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 organica acta*, 1, 1 :50-60.

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^{em} 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.

Larouadi A., Harkouk Y., (2012). Effet du décocté de *Zygophyllum album* Coss sur le diabète et le stress oxydant associé.

Lee Y.W., Jin S., Sim W.S., Nester E.W., (1996). The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium* genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the Vir A protein. *Gene*. 179 :83-88.

Li L., Jia Y., How Q., Charl T.C., Nester E.W., Pan S.Q., (2002). A global Ph sensor: *Agrobacterium* sensor protein *chevG* regulates acid inducible genes on its two chromosomes and Ti plasmid. *Microbiology*. (99) 19: 12369-12374.

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

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

Martins. T.M., Domingos. A., Novo.C., Lourenco. L., (2003). Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on *in vitro* rooting of *vitis vinifera*. *Vitis*. (42) 3: 159-161.

Mathysse A.G., Gurlitz R.H.G., (1982). Plant cell range for attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to tissue culture cells. *Physiol. Plant Pathol.* 21 :318-387.

Medjdoub H., (2013). Contribution à la recherche d'éventuelles activités biologiques de *Zygophyllum geslini* Coss. Thèse, Doc. Univ. Tlemcen, 127p.

Megdiche-Ksouri W., Medini F., Mkadmini K., Legault J., Magné C., Abdelly C., Ksouri R., (2013). LC–ESI–TOF–MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf. *Food Chemistry* 139 (2013) 1073–1080 SciVerse Science Direct.

Meng X.L., Riordan N.H., Casciari J.J., Zhu Y., Zhong J., Gonzalez M. J., Miranda-Massari J. R., Riordan H.D., (2002). Effects of a high molecular mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. *PR Health Science Journal*, 21: 323–328.

Mnafgui K., Kchaou M., Allouche N., Abdelfattah El Feki A., (2014). Essential oil of *Zygophyllum album* inhibits key-digestive enzymes related to diabetes and hypertension and attenuates symptoms of diarrhea in alloxan-induced diabetic rats. *Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences of Sfax, University of Sfax, Tunisia*.

Moore L.W., Kado C.I. Bouzar H., (1988). *Agrobacterium*. In laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria: 16-36. Nw s.c.h.a.a.d., aps press, saint paul, minnesota.

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

Moyano E., Jouhikainen K., Tammela P., Palazon J., Cusido R.M., Pinõl M.T., Teeri T.H., Oksman-Caldenty K.M. (2003). Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J. of Exp. Botany*. (54) 381: 203-211.

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

Nilsson O., Crozier A., Schmülling T., Sandberg G., Olsson O., (1993). Indole-3-acetic acid homeostasis in transgenic tobacco plants expressing the *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene. *Plant J.* 3, 681- 689.

Orlikowska TK., Cranston HJ., Dyer WE., (1995). Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of the Safflower cultivar 'Centennial'. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 40, p. 85–91.

Ould el hadj M., Didi H., Hadj-mahammed M., Zabeirou H., (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara Septentrional Est). *Courrier du Savoir – N°03*, Janvier 2003, pp. 47-51 Université Mohamed Khider – Biskra, Algérie.

Ozenda P., (1977). Flore et végétation du Sahara, Ed. CNRS. Paris, France, 662p.

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.

Pasandideh S.H.R., Niaki S.T., (2006). Multi-response simulation optimization using genetic algorithm within desirability function framework. *Appl. Math. Comput.* 175: 366–382.

performance goals using Derringer's desirability function. *J. Chromatogr.* 586: 11 – 20.

Quezel P., Santa S., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Ed. CNRS. Paris. Tome II.

Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W. Sagen H.E., (1930). Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agr. Res.* 41: 507-540.

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

Sasson A. (1991). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures:

Schmülling T., Schell J., Spena A., (1988). Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *Embo J.* **7**, 2621-2629.

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

Shimoda N., Toyoda-yamamoto A., Aoki S., Machida Y., (1993). Genetic evidence for an interaction between the VirA sensorprotein and the ChevE sugar binding protein of *Agrobacterium*. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol.268, n°35 : 26552-26558.

Shoja H.M., (2010). Contribution to the study of the *Agrobacterium rhizogenes* plast genes, *rolB* and *rolC*, and their homologs in *Nicotiana tabacum*. Thèse Doc. Univ. Strasbourg, France, 129p.

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

Srivastava S., Srivastava A.K., (2007). Hairy root culture for mass production of high value secondary metabolites. *Critical Reviews in biotechnology.* **7**: 29-43.

Stachel S.E., Nester E.W., (1986). The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Embo J.* **5**, 1445-1454.

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

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

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

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

Toivonen L., (1993). Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* **9** :12-20.

Tourte Y., (1998). Génie génétique et biotechnologie : concepts et méthodes. Ed. Dunod, 209p.

Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V., (2004). *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetic.* (20) 8 : 375-383.

Umber M., (2004). Etude de l'oncogène *ORF8 d'Agrobacterium*. Thèse Doct., Univ. Strasbourg I, 143 p.

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

Verpoorte R., Memelink J., (2002). "Engineering secondary metabolite production in plants." *Current Opinion In Biotechnology* **13**(2) : 181-187.

Vincent J.M., (1970). Manual for the practical study of root nodule bacteria. Ed. IBP. 164p.

White A., (1996). 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 Sciences, Amiens.

White F.F., Ghidossi G., Milton P., Gordon M.P., Nester E.W. (1982). Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Botany.* 79:3193-3197.

Wise A.A., Voinov L., Binns A.N., (2005). Inter subunit complementation of sugar signal transduction in VirA hereridimers and posttranslational regulation of VirA activity in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology.* Vol. 189, n°1.

Wlodarczyk A., (2010). Recherche de signaux moléculaires des végétaux impliqués dans l'induction de gènes chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*). Inst. Nati. des Sciences Appliquées de Lyon, 141p.

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.

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

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	----------

synthèse bibliographique

1. <i>Zygophyllum album</i>.....	3
1.1. Description botanique	3
1.2. Répartition et écologie	4
1.3. Contenu phytochimique et intérêt médicinal	4
2. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> et transformation génétique	7
2. 1. Description d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> et cartographie du plasmide <i>Ri</i>	7
2.2. Mécanisme d'infection.....	9
2.2.1. Adhésion bactérie – plante	10
2.2.2. Activation des gènes vir.....	10
2.2.3. Insertion de la T-DNA dans le génome de la cellule	10
2.3. Réaction de la plante à l'infection	11
3. Les chevelus racinaires	12
3.1. Avantages et intérêts	12
3.2. Facteurs influençant l'induction des chevelus racinaires par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	12
3.3 Production des chevelus racinaires	14
3.3.1. Préparation de la bactérie et suractivation des gènes vir.	14
3.3.2. Infection et co-culture plante-bactérie	15
3.3.3. Isolement et mise en culture in vitro des chevelus racinaires	15
3.3.4. Confirmation de la transformation génétique	15

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal	17
1.1. Origine.....	17
1.2. Méthode d'obtention du matériel végétal destiné à l'infection	17
1.2.1. Désinfection des graines	17
1.2.2. Vitrosemis	17
2. Souche bactérienne.....	19
2.1. Origine et description de la souche A ₄	19
2.2. Méthode de préparation des suspensions bactériennes.....	19
2.2.1. Activation de la bactérie A ₄	20
2.2.2. Mise en suspension.	20
3. Méthode de l'infection et de co-culture plante-bactérie.....	21
3.1. Etude de l'effet de l'acétosyringone et du glucose sur l'induction des chevelus racinaires.....	21
3.2. Co-culture plante-bactérie.....	21
4. Isolement des racines induites.....	21
5. Sélection et caractérisation des lignées des chevelus racinaires	22
6. Confirmation de la transformation	22
7. Plan d'expérience et traitement statistiques	23
8. Optimisation multicritère.....	27

Résultats et discussion

1. Obtention du matériel végétal destiné à l'infection	29
2. Effets de l'acétylsyringone et du glucose sur l'induction des chevelus racinaires.....	30
2.1. Le taux de réactivité ($Y_{Réac}$).....	30
2.2. Le Taux d'induction des racines (Y_{Ind}).....	33
2.3. Temps moyen d'apparition de la première racine (Y_{Temps}).....	35
2.4 Le nombre moyen de racines par explant (Y_{NMRE}).	36
3. Optimisation multicritère.....	37
4. Discussion	39
Conclusion.....	42
Références bibliographique.....	43