

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université SAAD DAHLAB, BLIDA1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master 2
Option : Sciences forestières

THEME

Induction de chevelus racinaires chez *Datura stramonium L* et extraction des métabolites secondaires

Présenté par : **Mme ZEMIH Naoual**

Jury:

Présidente : M^{me}. TAKARLI S. M.A.A. U.S.D., Blida
Promoteur : M. MORSLI A. M.C.A. E.N.S.A., El Harrach
Co-promotrice : M^{me}. LEMITI M.A.B. U.S.D., Blida
Examinatrice : M^{me}. TOUAHRIA S. M.C.B. U.S.D., Blida

Année universitaire 2017/2018

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et mes sincères reconnaissances à :

- *Mr MORSLI.*, Maitre de conférences A à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger de m'avoir guidé et dirigé dans mon travail et pour les conseils et les orientations qu'il m'a prodigués. Son aide et sa compréhension ont été de réels stimulants pour mener ce travail à terme.

- *Mme LEMITI*, Maitre-assistant B à l'Université Saad Dahlab de Blida pour son concours, sa patience, sa présence et ces encouragements.

- *Mme. TAKARLI*, Maitre-assistant A à l'Université Saad Dahlab de Blida, qui m'a fait l'honneur de présider le jury.

- *Mme. TOUAHRIA*, Maitre de conférences B à l'Université Saad Dahlab de Blida, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant d'être membre de jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à *Mr BEKHOUCHE* et à *Mlle TAIB* pour leur précieuse aide et pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ce travail.

Je remercie également l'équipe du Département de Foresterie et du personnel du Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies (LRGB) de l'ENSA pour leur soutien et encouragement.

Enfin, je remercie ma très chère famille, ma belle-famille ainsi que toutes mes amies pour leurs encouragements et soutien.

Merci à toutes et à tous qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail et qui m'ont épaulé.

Table des matières

Introduction.....	8
Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	2
I.1 Généralités sur les Datura.....	2
I.1.1 Origine et répartition	2
I.2 Caractéristiques de <i>Datura stramonium</i> L.....	2
I.3 Chevelus racinaires.....	4
I.3.1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	4
I.3.2 Mécanisme de la transformation par l'agrobactérie.....	5
I.3.3 Intérêts de la culture des chevelus racinaires	8
I.4 alcaloïdes	8
I.4.1 Classification.....	9
I.4.2 Alcaloïdes tropaniques	9
I.4.3 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques	10
I.4.4 Extraction des alcaloïdes.....	12
I.4.5 Dosage et identification des alcaloïdes	14
I.5 Elicitation.....	16
I.5.1 Eliciteurs.....	16
I.5.2 Classification des éliciteurs	16
II. Matériels et méthodes	20
II.1 Matériel.....	20
II.1.1 Matériel Biologique.....	20
II.1.2 Matériel	21
II.2 Méthodes : obtention de vitrosemis.....	21
II.2.1 La scarification.....	21
II.2.2 Désinfection des graines.....	22
II.2.3 Mise en culture <i>in vitro</i>	22
II.2.4 Activation des souches bactériennes	23
II.2.5 Transformation par <i>l'Agrobacterium rhizogenes in Vitro</i>	23
II.2.6 Isolement des lignées racinaires transgéniques	24
II.2.7 . Sélection des lignées racinaires performantes.....	25

II.2.8	Elicitation par le stress salin	25
II.3	Extraction des alcaloïdes	26
II.4	Dosage et identification de l'hyoscyamine	27
II.5	Analyse statistique	28
III.	Résultats et discussion	29
III.1	Germination des graines de <i>Datura stramonium</i>	29
III.2	Obtention des chevelus racinaires	30
III.2.1	Taux de réactivité	30
III.2.2	Taux d'induction racinaire transgénique.....	31
III.2.3	Temps moyens d'apparition de la première racine	32
III.2.4	Nombre moyen de racines par explant	33
III.3	Sélection des lignées racinaires performantes	33
III.4	La teneur en hyoscyamine	34
	Conclusion.....	37
	Références bibliographiques	39
	Annexes	40

Liste des abréviations

B5 : Milieu de culture de Gamborg et *al.*, 1968;

CPG : Chromatographie en phase gazeuse ;

Gr : Grossissement ;

HPLC : Chromatographie liquide haute performance ;

N1 : Lignée issue de la transformation de *Datura stramonium* par la souche 15834 ;

M2 : Lignée issue de la transformation de *Datura stramonium* par la souche A4 ;

LRGB : Laboratoire Ressources Génétiques et Biotechnologies ;

MS : Milieu de culture de Murashige et Skoog 1962;

M.S : Matière sèche ;

YEM : Extrait de levure mannitol.

Liste des figures

Figure 1. <i>Datura stramonium</i>	3
Figure 2. Mécanismes et principaux gènes impliqués dans le transfert de l'ADN-T d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dans les cellules végétales	6
Figure 3. Structures chimiques de 3 alcaloïdes tropaniques	10
Figure 4. Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques	11
Figure 5. Appareillage de la CPG	15
Figure 6. Graines matures de <i>Datura stramonium</i> utilisées pour l'obtention des vitrosemis ..	20
Figure 7. la morphologie de la lignée N1 traitée par 2 mg /l de CaCl ₂	26
Figure 8. Appareillage du dosage de l'hyoscyamine (CPG)	28
Figure 9. Germination des graines de <i>Datura stramonium</i>	29
Figure 10. vitrosemis de <i>Datura stramonium</i> âgés de 30 jours	30
Figure 11. Racine ordinaire issus d'un fragment d'hypocotyle	31
Figure 12. Induction des racines transgéniques.....	32
Figure 13. Aspect morphologique des lignées racinaires retenues	34
Figure 14. Courbe d'étalonnage de la CPG.....	35

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition chimique du milieu de culture YEM.....	23
Tableau 2. Temps moyens d'apparition de la première racine chez de <i>Datura</i>	3232
Tableau 3. Teneurs en hyoscyamine	3535

Introduction

Introduction

L'Algérie recèle un énorme réservoir de ressources phylogénétiques appartenant à différentes familles botaniques, utilisées depuis la plus haute antiquité en médecine populaire pour soigner un grand nombre de maladies. Les *Solanacées* figurent parmi les espèces les plus utilisées, à l'instar des *Datura* (*D. stramonium*, *D. ferox*, *D. inoxia*, *D. quercifolia*....) (MORSLI, 2013). Ces dernières sont spontanées en Algérie, et leur présence dans toutes les régions du pays leur confère un statut d'espèces cosmopolites (QUEZEL et SANTA, 1963). Celles-ci peuvent être valorisées pour la production des molécules bioactives utilisables aussi bien en médecine humaine que vétérinaire.

Par ailleurs, pour ses besoins pharmaceutiques, l'Algérie importe ces métabolites secondaires et ce, malgré la présence en Algérie, à l'état spontané, de nombreuses ressources phylogénétiques qui peuvent être valorisées (HOUMANI, 1999).

La production d'alcaloïdes par culture en plein champ dépend généralement des facteurs biotiques et abiotiques et de leurs interactions ajoutées à cela la complexité de leur synthèse par voie chimique souvent trop onéreuse. De ce fait, la production de ces derniers par voie biotechnologique constitue une alternative intéressante. En effet, la culture *in-vitro* offre l'avantage de contrôler les conditions environnementales et donc, une régularité de la production (SRIVASTAVA S et SRIVASTAVA a., 2007). Cependant certains systèmes cellulaires (suspensions cellulaires, calls) présentent l'inconvénient d'être génétiquement instables et peu productifs en métabolites secondaires. La solution réside donc dans la culture des chevelus racinaires induits par transformation génétique de *Datura* par *Agrobacterium rhizogenes* (GIRI et NARASU, 2000). Ce type de tissu présente une bonne stabilité génétique, une croissance rapide et illimitée et une production accrue en métabolites secondaires ce qui constitue un système de production efficient (RAHIMI et al., 2008).

Ainsi, une espèce spontanée d'Algérie et abondante du genre *Datura* : *Datura stramonium* fait l'objet de notre étude en vue de sa valorisation. A cet effet, notre travail comprendra donc trois chapitres. Le premier volet portera sur une synthèse qui reprend l'ensemble des travaux précédemment consacré à ce sujet. Le seconde, quant à lui, est consacré à l'approche de la méthodologie adoptée pour ce travail. Enfin le dernier chapitre, les résultats et leur discussion, ainsi que les perspectives concernant l'amélioration de la production de métabolites secondaires.

I. Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur les *Datura*

Le genre *Datura* appartient à la famille des Solanacées, c'est une grande famille de plantes herbacées ou arbustes à feuilles simples ou pennées, à fleurs hermaphrodites, elle comporte plus de 2000 espèces, dont les $\frac{3}{4}$ sont inclus dans le genre *Solanum* (BAKIRI, 2007).

Selon BIANCHINI et CORBITTA (1975), les *Datura* sont des solanacées à alcaloïdes tropaniques, ayant des propriétés thérapeutiques très recherchées en pharmacologie.

Les botanistes ne s'accordent pas tous quant à l'origine du mot *Datura*, selon POLETTI (1988), le terme *Datura* provient de dhatura qui est le nom indien de la plante et qui signifie "pomme épineuse" ou "pomme de la mort". Par ailleurs, BIANCHINI & PANTANO (1986) indique que ce terme viendrait du nom arabe "tatorah" dont la racine "tat" signifie piquer.

En Algérie, les espèces de *Datura* sont connues par plusieurs noms selon les régions, en Kabylie "Bounrjouf", aux Aurès "Netina" (DAMBRI, 1998).

Linné nommait les plantes de cette famille, les "blêmes", les "tristes", car les feuilles ont plutôt un aspect tombant avec des couleurs assez ternes (CHALANDRE, 2000 In MORSLI, 2013).

I.1.1 Origine et répartition

La plupart des *Datura* sont originaires d'Amérique du centre et de sud, d'Europe centrale et méridionale, d'Afrique du Nord et d'Asie occidentale (PELIKAN, 1986). Les *Datura* en Algérie sont cosmopolites (QUEZEL et SANTA, 1963), elles poussent à l'état sauvage, aux bords des routes, dans les décombres et dans les cultures (BENHIZIA, 1989 et HOUMANI, 1999). Les *Datura* préfèrent les sols argileux, légèrement basiques, humides et les expositions bien ensoleillées (HOUMANI et al., 1994).

Le genre *Datura* regroupe plusieurs espèces, dont cinq sont identifiées à l'état spontané en Algérie par Houmani (1999) ; *Datura ferox* L, *Datura innoxia* Mill, *Datura quercifolia* Humb, *Datura stramonium* L et *Datura tatula* L.

I.2 Caractéristiques de *Datura stramonium* L

Le *Datura stramonium* L a été décrit pour la première fois en 1753 par Linné (BENHIZIA, 1989), il appartient à la famille des solanacées (QUEZEL et SANTA, 1963).

Le *Datura stramonium* (fig.1) est une plante herbacée annuelle très vigoureuse de port puissant allant de 20 à 100 cm de hauteur (VOLAK et JIRI, 1983). La tige est arrondie, porte des feuilles ovales aiguës profondément découpées en lobes inégaux pointus et marquées par des nervures saillantes, axillaires, grandes (BRUNETON, 2005). Le pétiole mesure 2 à 6 cm et le limbe de (5 à 13) x (3 à 15) cm (AMDOUN et *al.*, 2005a). Les fleurs érigées sont insérées de manière solitaire au point de départ des ramifications. Le calice de la fleur est tubulé, surmonté d'une corolle gamopétale à cinq lobes. Le fruit est une capsule érigée épineuse ovoïde ou globuleuse de (3 à 4)- (2 à 5) cm. Il possède quatre valves qui s'ouvrent à maturité pour libérer plusieurs graines noires rugueuses et réniformes (AMDOUN et *al.*, 2005a). La racine est fusiforme et ramifiée (THURZOVA, 1981 et PELIKAN, 1986). le *Datura stramonium* possède douze paires de chromosomes, soit à l'état diploïde ($2n = 2x = 24$) ou tétraploïde ($2n = 4x = 48$) (ROSSIGNOL et *al.*, 2004).



Figure 1. *Datura stramonium* (CSAPODY, 1961)

Intérêt de *Datura stramonium* :

La stramoine a des propriétés médicinales appréciées depuis fort longtemps (PLAN, 1988). Employée contre les convulsions, l'épilepsie, les tremblements séniles, les douleurs

rhumatismales, les névralgies, l'asthme et divers troubles du système nerveux (POLETTI, 1988).

De plus de son rôle dans la pharmacologie, le *Datura* trouve plusieurs applications dans de multiples domaines tels que l'ornementation, l'écologie, la lutte biologique et l'agriculture biologique (DUVAL, 1991).

Le *Datura stramonium* est une très belle plante qui présente un grand intérêt ornemental, par ces larges feuilles dentées et ces belles fleurs décorative (VERDRAGER, 1978).

Selon ROLARD (2002), le *Datura stramonium* peut être utilisé aussi dans le domaine écologique pour désinfecter les eaux et les sols pollués, en digérant les déchets radioactifs, ainsi ces derniers seront concentrés sur les parois de ses cellules.

D'après BELIARD et al (2002), le *datura stramonium* peut être utilisé dans le cadre de lutte biologique contre plusieurs ravageurs tel que les acariens et les aleurodes.

I.3 Chevelus racinaires

I.3.1 *Agrobacterium rhizogenes*

Le genre *Agrobacterium* appartient à la sous-classe alpha 2 *Proteobacteria* et à la famille des *Rhizobiaceae* (Woese et al., 1984). Il regroupe plusieurs espèces dont les deux plus connues sont *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes*(TOURTE, 1998). Ces bactéries ont la faculté de transférer une partie de leur ADN dans le noyau de certaines cellules végétales (SCRIBAN, 1999).

L'*Agrobacterium rhizogenes* est une bactérie du sol gram-négatif encapsulée (MOORE et al., 2001 in BELASKRI, 2006). Cette bactérie se présente sous forme de bacille de 0,6 à 1 µm de largeur et de 1,5 à 3 µm de longueur. Elle est mobile grâce à 1 à 6 flagelles. Elle vit en aérobie, car elle possède un métabolisme du type respiratoire avec l'oxygène comme dernier accepteur d'électrons. Elle est toutefois capable de croître sous des tensions réduites en oxygène dans les tissus de la plante (CHRIQUI, 1998).

L'*Agrobacterium rhizogenes* est un parasite de nombreuses plantes dicotylédones et quelques espèces monocotylédones (TIKHOMIROFF, 2001). Elle provoque chez ces plantes une

abondante prolifération des racines (DAVET, 1996) : c'est la « *maladie du chevelu racinaire* » ou « *hairy root disease* » (CASSE et BREITLER, 2001 ; KUMAR *et al.*, 2006).

Cet effet morphogénétique dépend de la présence dans la bactérie d'un épisome particulier appelé plasmide Ri (root inducing) (TEPFER, 1982).

Les plasmides circulaires d'ADN bicaténaire sont présents sous forme de plusieurs exemplaires identiques, ils comprennent 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 sur la propriété de virulence de la bactérie.

I.3.2 Mécanisme de la transformation par l'agrobactérie

L'*A. tumefaciens* est plus étudiée que l'*A. rhizogenes*. Aussi, les mécanismes cellulaires de transformation sont généralement décrits chez l'*A. tumefaciens* (Figure. 2). Néanmoins, ces mécanismes restent semblables à ceux de l'*A. rhizogenes* (TIKHOMIROFF, 2001 ; KOVALENKO et MALIUTA, 2003). On peut dissocier le mécanisme de la transformation en trois étapes :

- 1- Adhésion bactérie-plante ;
- 2- Activation des gènes de virulence « *vir* » ;
- 3- Exportation et insertion de l'ADN-T dans le génome de la cellule hôte.

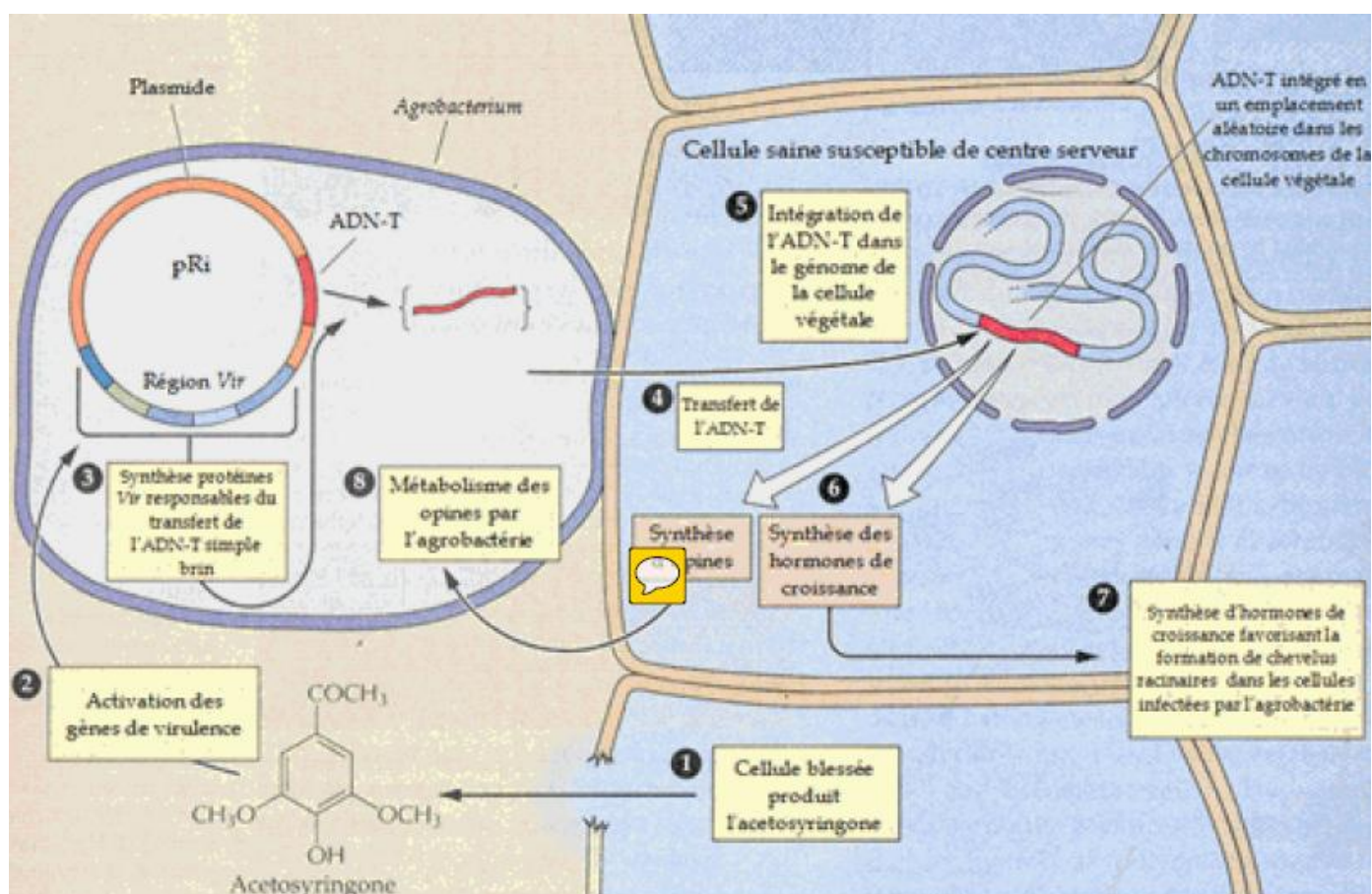


Figure 2. Mécanismes et principaux gènes impliqués dans le transfert de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les cellules végétales (GELVIN, 2003)

1.3.2.1 Adhésion bactérie-plante

L'adhésion de la bactérie sur les cellules de la plante est une étape indispensable au processus d'infection. La bactérie doit se maintenir attachée au site cible pour créer un pilus de conjugaison reliant les deux membranes cellulaires (LIPPINCOT et LIPPINCOT, 1969 *in* BELASKRI, 2006). Les gènes responsables de l'attachement sont portés par le chromosome bactérien (CASSE et BRIETLER, 2001 ; SCRIBAN, 1999). Les gènes *chvA*, *chvB* et *exoC* sont responsables de la synthèse d'un polysaccharide périplasmique (β -1,2- glucane) excrété hors de la bactérie. Ce polysaccharide serait impliqué dans la capacité d'accrochage de la bactérie aux cellules végétales. Un autre polysaccharide de type cellulose joue le rôle de stabilisation de l'adhésion une fois qu'elle est initiée (MATHYSSE et GURLITZ *in* TIKHOMIROFF, 2001).

1.3.2.2 Activation des gènes vir

L'activation des gènes *vir* est un phénomène indépendant de l'adhésion d'*Agrobacterium* sur une cellule végétale (LEROUX et *al.*, 1987 in TIKHOMIROFF, 2001). Les gènes *vir* sont activés par des signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure comme :

- 1- Les monosaccharides tels que le glucose et l'acide glucorinique (TIKHOMIROFF, 2002) ;
- 2- Le pH acide (TIKHOMIROFF, 2002) ;
- 3- Les composées phénoliques dérivés du syringol (le plus actif étant l'acétosyringone) (GIRI et NARASU, 2000 ; CHUPEAU, 2001 ;TIKHOMIROFF, 2002).

1.3.2.3 Insertion de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale

L'ADN-T qui est transféré est une partie bien définie du plasmide Ri chez l'*Agrobacterium rhizogenes*. C'est sous forme de simple brin qu'il est exporté dans le noyau de la cellule végétale cible. Les protéines *VirD1* et *VirD2* sont des endonucléases spécifiques qui reconnaissent les bords de l'ADN-T. Elles excisent ainsi le brin qui en sera exporté. *VirD2* s'attachent de manière covalente sur l'extrémité 5' du simple brin de l'ADN-T. Le brin d'ADN-T est recouvert par plusieurs copies (environ 600) de la protéine *VirE2*, ce qui permettrait sa protection contre les nucléases de la cellule végétale cible (HOWARD et CITOVSKY, 1990). Une fois qu'il est dans le noyau, l'ADN-T s'intègre par un processus de recombinaison aléatoire et non homologue (Fig. 5) (CRETE, 2006). Selon CHUPEAU (2001), il y'a resynthèse de la portion coupée entre les sites de coupure et régénération d'un ADN-T double brin.L'ensemble *VirD2*, *VirE2* et l'ADN-T constituent le "complexe T" (DAVET, 1996 ; SCRIBAN, 1999 ; TZFIRA et *al.*, 2004).

L'intégration de l'ADN-T au sein du génome nucléaire de la plante se fait au hasard dans les parties qui sont régulièrement transcrites. Plusieurs copies de l'ADN-T peuvent se trouver dans le génome de la cellule végétale (TIKHOMIROFF, 2002 ; TZFIRA et *al.*, 2004).

L'expression de l'ADN-T chez les plantes se traduit par, la formation d'un chevelu racinaire abondant au site d'infection. Ce chevelu a la faculté de synthétiser des opines qui diffèrent selon les souches bactériennes (agropine, nopaline, octopine, mannopine) (DAVET, 1996).

I.3.3 Intérêts de la culture des chevelus racinaires

Depuis 1980, les chevelus racinaires ont été utilisés comme un système expérimental pour l'étude du métabolisme racinaire, et même comme alternative à la culture de suspensions cellulaires pour la production des principes actifs (LANOUE *et al.*, 2004). A partir de l'année 1985, l'approche de production de métabolites secondaires par les chevelus racinaires a été utilisée par de nombreux laboratoires dans le monde et pour une multitude d'espèces et de métabolites secondaires (FLORES et MEDINA-BOLIVAR, 1995).

Plusieurs métabolites secondaires d'intérêts sont synthétisés au niveau des racines. La culture de chevelus racinaires pour la production de principes actifs, passe de la petite échelle (au laboratoire) vers la production industrielle à grande échelle (GUILLON *et al.*, 2006).

Les racines transformées présentent une structure à développement rapide, dont la croissance peut se faire dans un milieu sans hormones (BELABBASSI et BENOURET, 2009). Elles croissent à la même vitesse ou plus vite que les cultures cellulaires (FLORES *et al.*, 1999). Elles atteignent des densités très élevées et peuvent produire des taux significatifs de métabolites secondaires (SOURET *et al.*, 2003).

Contrairement aux cultures cellulaires, la culture des chevelus est caractérisée par une stabilité génétique et biosynthétique élevée (GIRI et NARASU, 2000 ; GUILLON *et al.*, 2006 ; SRIVASTAVA et SRIVASTAVA, 2007).

I.4 Les alcaloïdes

De par leur nombre et leur diversité, les alcaloïdes constituent le groupe le plus important des métabolites secondaires. Le terme d'alcaloïde (de al kaly= la soude ; alcaloïde = qui a l'apparence d'une base), a été introduit pour la première fois par le pharmacien Allemand Meisner en 1818 pour désigner toutes les substances naturelles qui réagissent comme des bases (BRUNETON, 1987).

Selon Mauro (2006), les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques provenant essentiellement des plantes et qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure, avec un degré variable de caractère basique. Ils sont distincts des autres composés azotés comme les aminoacides, les bétalaïnes, les peptides, les amino-sucres, les vitamines azotées, les porphyrines et les alkylamines (BRUNETON, 1987).

I.4.1 Classification

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

Plusieurs types de classification ont été proposées mais seule la classification biogénétique a été retenue et est la plus utilisée (BRUNETON, 1987). L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable est alors de classer les alcaloïdes en groupes selon leur précurseur biosynthétique. Ainsi, il existe des alcaloïdes dérivés de l'ornithine, de la lysine, de la tyrosine, de la phénylalanine et du tryptophane (MAURO, 2006).

I.4.2 Alcaloïdes tropaniques

Les alcaloïdes tropaniques, tels que l'hyoscyamine, la scopolamine et l'atropine (fig.5), constituent l'un des groupes les plus importants de métabolites secondaires chez les *Solanaceae* (GRIFFIN et LIN, 2000 ; IZOUINE, 2001 et WIART, 2006). Ils sont particulièrement abondants dans certains genres, comme *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, *Scopolia*, *Mandragora*, et *Duboisia* (POLYA, 2003 et WINK, 2003).

Ces alcaloïdes ont des propriétés antispasmodiques dans le système gastro-intestinal et également des propriétés anti-sécrétrices (utiles au cours des interventions chirurgicales). L'atropine est largement utilisée dans le domaine de l'ophtalmologie en tant qu'agent mydriatique (pour dilater la pupille) (MAURO, 2006).

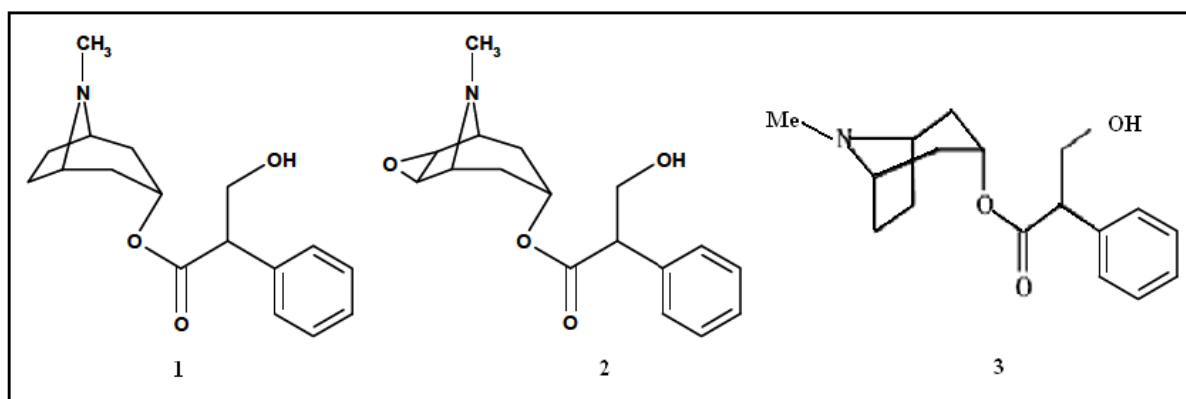


Figure 3. Structures chimiques de 3 alcaloïdes tropaniques (PALAZON *et al.*, 2008)

1 : Hyosciamine, 2 : Scopolamine, 3 : Atropine

I.4.3 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques

La biosynthèse des alcaloïdes tropaniques a attiré l'attention de plusieurs auteurs (Duran-Patron *et al.*, 2000). Ainsi, les grandes lignes de la biosynthèse des alcaloïdes sont connues, notamment grâce à l'emploi d'éléments marqués (GUIGNARD, 1979).

Les alcaloïdes tropaniques sont produits principalement chez les solanacées. L'hyoscyamine et la scopolamine (qui sont les plus importants alcaloïdes des *Datura*) sont issus du cycle de polyamine. Les deux précurseurs de la chaîne de biosynthèse sont : l'ornithine et l'arginine et les deux activités enzymatiques initiales sont l'ornithine décarboxylase (OrnDC) et l'arginine décarboxylase (ArgD) (VALLET, 1996) (Figure 4).

Selon HEBY (1981), l'hyoscyamine provient de l'estérification de l'acide tropique et du tropanol, ce dernier est synthétisé à partir de l'ornithine, qui est méthylée par l'ornithine méthyl transférase (OrnMT) en *N*-méthyl ornithine. Une décarboxylation, conduit à la *N*-méthyl putrescine, qui peut également provenir de la méthylation de la putrescine par la putrescine *N*-methyltransférase (PMT). L'action de la *N*-méthyl putrescine oxydase engendre le 4-méthylamino-butanol, qui par décarboxylation donne le noyau *N*-méthylpyrrolinium, sa condensation avec l'acétoacétate donne l'hygrine. La cyclisation de cette dernière conduit au tropinone qui sera réduit par la tropinone réductase I (TR-I) en tropine. L'acide tropique, quant à lui, dérive de la phénylalanine. La tropine estérifiée par l'acide tropique donne ainsi l'hyoscyamine.

La biosynthèse de la scopolamine est complexe, mais cet alcaloïde est directement issu de l'hyoscyamine par époxydation. Ce phénomène met en jeu deux enzymes : l'hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H) localisée au niveau du péricycle des jeunes racines et l'hyoscyamine 6 β -époxydase localisée dans les feuilles (HASHIMOTO *et al.*, 1986-1987-1991 *in* VALLET, 1996).

Chez le *Datura*, l'hyoscyamine est synthétisée dans les racines et transportée par le xylème jusqu'aux feuilles, et elle peut être redistribuée par le phloème. Tandis que sa conversion en scopolamine par époxydation a essentiellement lieu dans le mésophile photosynthétique des feuilles (très peu dans les racines) (VALLET, 1996).

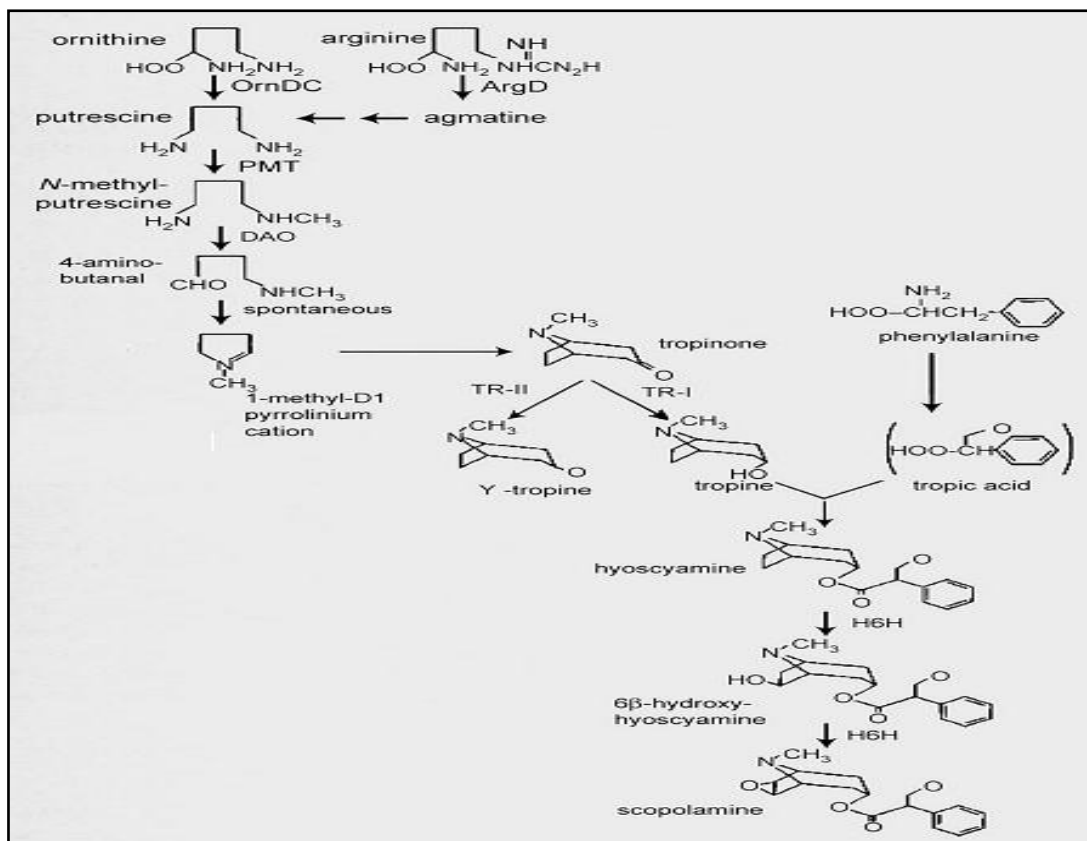


Figure 4. Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (LEE *et al.*, 2004)

OrnDC : Ornithine décarboxylase ;

ArgD : Arginine décarboxylase ;

PMT : Putrescine N-méthyltransférase ;

TR-I et TR-II : Tropinone réductase I et II ;

H6H : Hyoscyamine 6 β -hydroxylase.

I.4.4 Extraction des alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes est fondée, en règle générale, sur le fait qu'ils existent dans la plante à l'état de sels ou de combinaisons solubles, sur leur caractère basique et donc sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau et dans les solvants en fonction du pH (BRUNETON, 1987). Donc l'isolement et l'analyse des alcaloïdes se fondent généralement sur les différences dans la solubilité de la forme de base -libre et de la forme acide. La base libre est habituellement soluble dans les solvants hydrophobes (MAKKAR *et al.*, 2007). L'extraction est généralement réalisée par des solvants organiques non polaires, par des solvants organiques polaires ou par l'eau acidifiée (PARIS et HURABIELLE, 1981).

I.4.4.1 Extraction proprement dite

Deux méthodes sont utilisées : l'extraction en milieu alcalin (par un solvant) et l'extraction en milieu acide (par l'eau ou par une solution alcoolique ou hydroalcoolique).

a. Extraction par un solvant en milieu alcalin

Selon BRUNETON (1995) :

- La drogue pulvérisée est mélangée à une solution aqueuse alcaline qui déplace les alcaloïdes de leurs combinaisons salines, les bases ainsi libérées sont ensuite solubilisées dans un solvant organique.
- L'agent d'alcalinisation est très souvent l'ammoniaque. Le solvant organique peut être un solvant chloré, le benzène ou l'éther diéthylique.
- Le solvant organique contenant les alcaloïdes bases est séparé, et si nécessaire, concentré par distillation sous pression réduite. Il est alors agité à plusieurs reprises avec une solution aqueuse acide. Les alcaloïdes se solubilisent sous forme de sels dans la phase aqueuse tandis que les pigments, stérols et autres impuretés restent en solution dans la phase organique. Les acides utilisés sont variables (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, acide sulfamique ou acide citrique) mais toujours en solutions diluées.
- Les solutions aqueuses de sels d'alcaloïdes sont alcalinisées par une base en présence d'un solvant non miscible. L'épuisement de la phase aqueuse est poursuivi jusqu'à ce que tous les alcaloïdes soient repassés en phase organique.

- Le solvant organique contenant les alcaloïdes bases est décanté, débarrassé des traces d'eau qu'il peut renfermer par déshydratation avec un sel anhydre et évaporé sous vide. Il reste alors un résidu : les alcaloïdes totaux.

b. Extraction en milieu acide

Deux cas peuvent se présenter :

- Dans le premier cas, la drogue pulvérisée est directement épuisée par de l'eau acidifiée ;

- Dans le deuxième cas, c'est avec une solution alcoolique ou hydroalcoolique d'acide que l'épuisement est réalisé. Dans ce cas la solution extractive est concentrée par distillation sous vide pour chasser l'alcool.

Dans les deux cas on se retrouve donc avec une solution aqueuse de sels d'alcaloïdes qui peut être traitée de différentes façons (BRUNETON, 1987):

1. Alcalinisation et extraction des bases par un solvant organique non miscible.
2. Fixation des alcaloïdes sur des résines échangeuses d'ions puis élution par des acides forts.
3. Précipitation des alcaloïdes sous la forme d'iodomercures par du réactif de Mayer concentré, le complexe formé est récupéré par filtration ou centrifugation, redissout dans un mélange hydro-alcool-acétonique et décomposé par passage sur des résines échangeuses d'ions.

1.4.4.2 Purification

Quelle que soit la méthode choisie pour extraire les alcaloïdes, ce ne sont pas des produits purs qui sont obtenus mais des alcaloïdes totaux, souvent, un mélange de bases. Dans le meilleur des cas l'un des alcaloïdes est majoritaire et peut être obtenu par cristallisation directe. Dans d'autres cas, les divers alcaloïdes du mélange ont des basicités différentes, ce qui autorise des réextractions sélectives à des *pH* variables (BRUNETON., 1995).

Dans beaucoup de cas, il est nécessaire de recourir aux méthodes classiques de résolution des mélanges complexes, particulièrement aux techniques chromatographiques (sur le gel de silice, d'alumine ou sur les résines d'échange ionique). Dans les laboratoires de recherches,

souvent, les techniques, aussi bien que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie sur couche mince préparatoire (CCM) sont employées (BRUNETON, 1995).

I.4.5 Dosage et identification des alcaloïdes

Les méthodes chromatographiques telles que la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) conviennent bien à l'étude des alcaloïdes (DRAGER, 2002).

La chromatographie est un outil analytique de plus en plus utilisé pour la séparation, l'identification et la quantification de composés chimiques dans des mélanges complexes comme des extraits de plante (BURGOT et BURGOT, 2006 ; Chaunu, 2009).

I.4.5.1 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Elle constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier et quantifier les corps gazeux ou volatilisables (CHAUNU, 2009).

a. Principe

En chromatographie en phase gazeuse l'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. Contrairement à la plupart des autres chromatographies, il n'y a pas d'interaction entre les molécules d'analyte et la phase mobile ; la seule fonction de celle-ci est de transporter l'analyte dans la colonne. Il existe deux types de CPG : la chromatographie gaz-solide (CGS) et la chromatographie gaz-liquide (CGL) (SKOOG *et al* 2003).

b. Appareillage de la CPG (Fig. 7)

- Alimentation en gaz vecteur

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

- Système d'injection de l'échantillon

L'efficacité de la colonne exige que l'échantillon occupe le volume adéquat. On l'introduit sous forme d'un « bouchon » de sa vapeur. La méthode la plus courante consiste à utiliser une microsiringue avec laquelle on injecte l'échantillon liquide ou gazeux à travers un diaphragme ou un septum en élastomère dans une chambre à vaporisation instantanée située en tête de la colonne (SKOOG *et al.*, 2003).

- Configuration des colonnes et de leurs fours

Il existe deux types de colonnes, les colonnes remplies (ou colonnes à garnissage) et les colonnes capillaires. Elles n'offrent pas les mêmes performances. Pour les colonnes remplies, la phase stationnaire est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. Pour les colonnes capillaires, une faible épaisseur de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne (ROUESSAC et ROUESSAC., 2005).

- Systèmes de détection

Ces types d'appareils, servent non seulement à détecter la présence des différents analytes à la sortie de la colonne, mais aussi à les identifier. Il existe les détecteurs à ionisation de flamme (FID) qui sont les plus utilisés. Dans un brûleur l'effluent de la colonne est mélangé avec de l'hydrogène et de l'air qui sera enflammé électriquement (SKOOG *et al.* 2003).

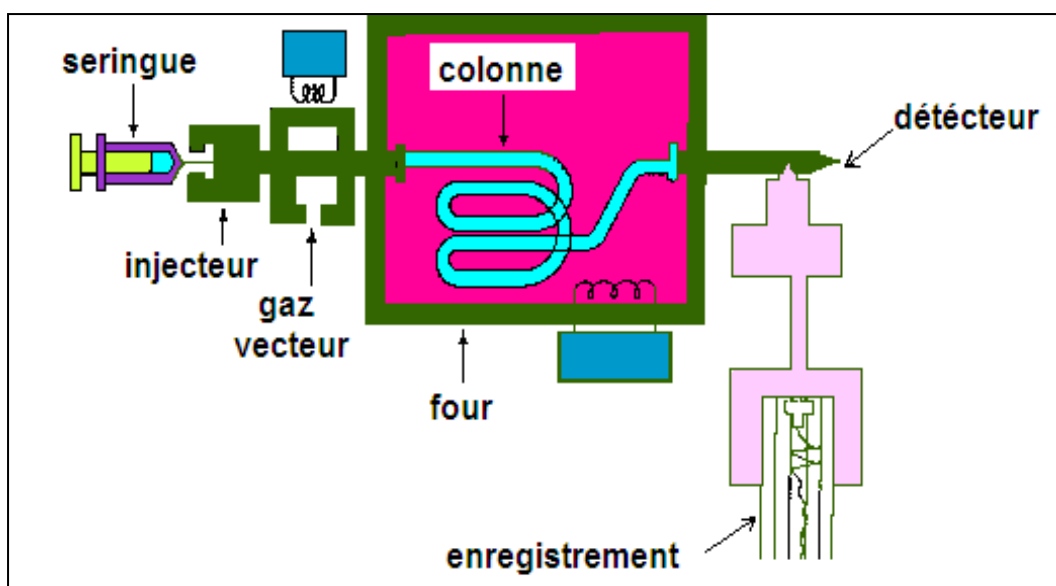


Figure 5. Appareillage de la CPG (CHAUNU, 2009)

I.5 Elicitation

Les plantes répondent à l'attaque des pathogènes, des ravageurs ainsi qu'aux agressions occasionnées par les conditions du milieu environnant (stress abiotiques) par l'activation d'une série de mécanismes de défense qui amènent au déclenchement de la biosynthèse des métabolites secondaires dont les phytoalexines et les alcaloïdes (HE *et al.*, 2002 ; VASCONSUELO et BOLAND, 2007).

L'élicitation consiste en l'induction de la biosynthèse des métabolites secondaires par des substances dites « éliciteurs » (RADMAN *et al.*, 2003).

I.5.1 Eliciteurs

Le terme « éliciteur » s'appliquait à l'origine aux molécules susceptibles d'induire la production de métabolites secondaires (GADZOSKA *et al.*, 2004). Il est maintenant utilisé pour l'ensemble des molécules qui induisent des réactions de défense chez les plantes (MONTESANO *et al.*, 2003).

L'addition d'éliciteurs aux milieux de culture des tissus en culture *in-vitro* a déjà été connue depuis les années 1980 (DICOSMO *et al.*, 1987 ; FUNKA *et al.*, 1987 ; TYLER *et al.*, 1988 ; HOLDEN et YEOMAN, 1994). Ainsi, FUNKA *et al.* (1987) ont stimulé la biosynthèse de la berbérine chez *Thalictrum rugosum* en ajoutant comme éliciteur de l'acide malique et de l'alginate de sodium.

I.5.2 Classification des éliciteurs

Selon NAMDEO (2007), les éliciteurs peuvent être classés sur la base de leur nature en éliciteurs abiotiques et éliciteurs biotiques, ou sur la base de leur origine en éliciteurs exogènes et éliciteurs endogènes.

I.5.2.1 Eliciteurs abiotiques

Les éliciteurs abiotiques sont des substances dont l'origine n'est pas biologique et dont les sels inorganiques sont les plus dominants. Ces derniers, présentent des facteurs physiques agissant en tant qu'éliciteurs comme le Cu, les ions Cd et le Ca²⁺ (VEERSHAM, 2004).

Selon NAMDEO (2007), les principaux éliciteurs abiotiques sont :

- De nature physique ou chimique fonctionnant par l'intermédiaire des éliciteurs biotiques formés de manière endogène ;

- Des rayons UV ou des protéines dénaturées ;
- Des composants non essentiels du milieu de culture (agarose, étain) ;
- Des métaux lourds ;
- D'une grande affinité avec l'ADN ;
- Des fongicides (Maneb, Buthylamine) ;
- Des herbicides (Acifluorfen).

1.5.2.2 Eliciteurs biotiques

Les éliciteurs biotiques sont des substances d'origine organique. Ils comprennent des polysaccharides dérivés des parois cellulaires de la plante (pectine ou cellulose), les micro-organismes (chitine ou glucane), les glycoprotéines et la G-protéine ou les protéines intracellulaires dont les fonctions sont couplées aux récepteurs en activant ou en désactivant un certain nombre d'enzymes ou de canaux d'ions (NAMDEO, 2007).

Selon NAMDEO (2007), les principaux éliciteurs biotiques sont :

- Directement libérés par des micro-organismes et reconnus par la cellule de la plante (enzymes, fragments de paroi cellulaire) ;
- Formés par l'action des micro-organismes sur la paroi cellulaire de la plante (fragments de pectines et autres) ;
- Formés par l'action des enzymes de la plante sur les parois des cellules microbiennes (chitosane, glucane) ;
- Des composés endogènes et de nature constitutive, formés ou libérés par la cellule en réponse à divers stimulants.

1.5.2.3 Eliciteurs exogènes et endogènes

Les éliciteurs exogènes ont une origine externe à la cellule, ils sont sécrétés en dehors de la cellule comme les polysaccharides, les polyamines et les acides gras. Tandis que les éliciteurs endogènes sont des substances sécrétées à l'intérieur de la cellule comme le galacturonide ou l'hepta- β -glucosides (NAMDEO, 2007).

Les éliciteurs exogènes selon NAMDEO (2007) sont :

- D'origine externe à la cellule, entrant dans la réaction immédiatement ou par l'intermédiaire d'agents endogènes.
- Des polysaccharides : glucomannose, glucane, chitosane ;
- Des peptides comme les poly-cations: monilicoline, polyamines, glycoprotéines ;
- Des enzymes: polygalacturonase, endo-polygalaturonique lyase, cellulase ;
- Des acides gras : acide arachidonique, acide eicosapentanoïque.

Les éliciteurs endogènes selon NAMDEO (2007) sont :

- Formés par l'intermédiaire des réactions secondaires induites par un signal de nature biotique ou abiotique dans la cellule ;
- Le dodeca- 1,4-D- galacturonide ;
- L'hepta- β - glucoside ;
- L'alginate oligomère.

1.5.2.4 Elicitation par le stress salin

Le terme “stress”, un mot d'origine anglaise est défini comme étant l'ensemble des perturbations biologiques et physiques provoquées par une agression quelconque sur un organisme. En revanche, ce terme, lorsqu'il est utilisé en biologie végétale a des connotations particulières ; il présente le(s) facteur(s) responsable(s) des perturbations subies par la plante au cours de son développement. Au sens strict du terme, la définition du stress ne comprend pas la réponse de l'organisme aux contraintes mais uniquement les contraintes elles-mêmes (ROEDER, 2006).

Ces stress sont soit de nature abiotique, d'origine physique (entre autres, la sécheresse, la température et les blessures) ou chimique (dont la salinité, le *pH* du sol et les produits chimiques), soit de nature biotique (agression par les microorganismes, compétition).

Les métabolites secondaires sont souvent biosynthétisés en abondance comme une réponse à un stress biotique ou abiotique (HUTCHESON, 1998 ; HE *et al.*, 2002). L'élicitation est un traitement qui imite un stress. Elle induit l'expression de gènes responsables de la biosynthèse de métabolites secondaires (ROBBERTS et SHULER, 1997). L'élicitation constitue une stratégie de choix pour l'amélioration de la production de diverses substances par voie biotechnologique (ZHAO *et al.*, 2005 ; VASCONSUELO et BOLAND, 2007).

Depuis plusieurs années déjà, l'effet du stress salin sur la production de métabolites secondaires chez les plantes médicinales a fait l'objet de nombreuses études (SPOLLANSKY *et al.*, 2000 ; AJUNGLA *et al.*, 2009 ; KHELIFI *et al.*, 2011). Ainsi, le chlorure d'aluminium (AlCl_3) a été utilisé par SPOLLANSKY *et al.*, (2000) sur une culture de chevelu racinaire de *Brugmansia condida*. Effectivement, les racines transformées exposées durant 48 h à des concentrations d' AlCl_3 variant de 25 à 250 mM présentent des augmentations en alcaloïdes de 43 à 83 %. Après 48h de traitement avec des concentrations élevées de AlCl_3 , la scopolamine augmente dans le milieu de culture de 150%. Par ailleurs, une accumulation d'alcaloïdes tropaniques a été observée après élicitation de cultures de chevelus racinaires de *Brugmansia condida* par deux éliciteurs abiotiques : AgNO_3 et CdCl_2 . En outre, ce dernier, bien qu'il augmente l'accumulation des alcaloïdes tropaniques inhibe la croissance du chevelu racinaire (PITTA –ALVAREZ *et al.*, 2000 in RADMAN *et al.*, 2003).

KHELIFI *et al.*, (2011), montrent que le traitement de cultures de racines transformées de *Datura stramonium* par 2g/l de NaCl pendant 24 heures augmente l'accumulation des alcaloïdes tropaniques 3 fois par rapport au témoin.

II. Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

Les solanacées, particulièrement les espèces du genre *Datura* sont connues pour leur contenant en alcaloïdique (HOUMANI, 1999). Une espèce de *datura stramonium l* a fait l'objet de notre étude en vue de sa valorisation. Pour cela, nous nous sommes intéressées à :

- L'induction des chevelus racinaires chez *Datura stramonium* par la souche A4 et 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes*;
- La sélection des lignées racinaires performantes ;
- L'optimisation de la production de chevelus racinaires sur milieu liquide ;
- L'extraction des alcaloïdes ;
- Le dosage et l'identification des alcaloïdes par chromatographie en phase gazeuse.

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel Biologique

II.1.1.1 Matériel végétal

Les graines de *Datura stramonium* utilisées sont issues d'une population spontanée récoltées au niveau d'Ain Taya (wilaya d'Alger) (Fig. 6), récoltées en Janvier 2018.

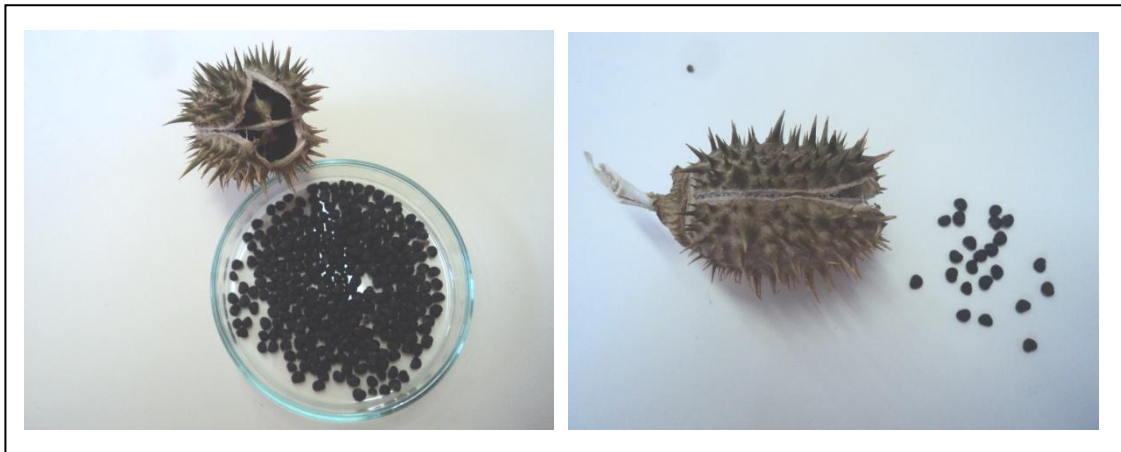


Figure 6. Graines matures de *Datura stramonium* utilisées pour l'obtention des vitrosemis

II.1.1.2 Matériel bactérien

Deux souches bactériennes sont utilisées dans le cadre de notre étude: la souche A4 et la souche 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Les deux souches de l'*Agrobacterium rhizogenes* utilisées sont originaires de la Californie (Etats-Unis), elles ont été obtenues par Dubrin (BOUZAR, 1983). Ce sont des souches à agropine (LAMBERT *et al.* 1988). Elles portent le plasmide Ri dont l'ADN-T est constitué de deux segments, le T_R-DNA (right-DNA) qui porte les gènes de synthèse d'auxine (Taylor *et al.*, 1985; Bensaddek *et al.*, 2010) et le T_L-DNA (left- DNA), qui porte les gènes *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD*, ces derniers dirigent la synthèse d'une substance responsable de la programmation des cellules pour se différencier en racines sous l'influence d'auxines endogènes (GELVIN, 2003). Ces deux fragments peuvent être transférés aux cellules hôtes individuellement ou ensemble, avec un nombre variable de copies (STOUGAARD *et al.* 1987).

L'entretien de la souche bactérienne se fait au niveau du laboratoire de recherche des Ressources Génétiques et Biotechnologies (LRGB, ENSA-Alger). Cette opération consiste à multiplier les bactéries âgées de 6 mois sur milieu YEM (VINCENT, 1970) gélosé et neuf.

II.1.2 Matériel

Instruments et équipements utilisés (**Annexe1**) :

- Distillateur ;
- Balance de précision ;
- pH mètre ;
- agitateur-plaque chauffante ;
- l'étuve ;
- autoclave ;
- Hote laminaire.

II.2 Méthodes : obtention de vitrosemis

II.2.1 La scarification

La scarification des graines est réalisé selon la méthode préconisée par **KHELIFI-SLAOUI *et al.* (2005)** qui consiste à frotter ces derniers entre deux feuilles de papier à verre (80 point).

II.2.2 Désinfection des graines

Sous hotte, les graines scarifiées sont désinfectées par un trempage dans de l'hypochlorite de sodium à 12° avec deux gouttes de tween 20 pendant 12 minutes, suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile et un séchage sur du papier filtre stérile.

II.2.3 Mise en culture *in vitro*

Après désinfection et séchage, 60 graines sontensemencées directement dans des tubes contenant environ 20 ml de milieu de culture MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) (Annexe2).

II.2.3.1 Préparation de milieux de culture

Pour la préparation de milieu de culture, on utilise des solutions concentrées des éléments nutritifs entrant dans la composition de milieu (Annexe 2) et que l'on dilue de façon adéquate.

On se sert couramment de 4 solutions-mères :

- une solution-mère comprenant tous les sels minéraux (macroéléments);
- une solution-mère comprenant les microéléments ;
- une solution-mère comprenant le chélate de Fer : Fe-EDTA ;
- une solution-mère comprenant les vitamines.

Pour la préparation d'un litre de milieu de culture, on prélève de chaque solution concentrée les quantités suivantes :

- 50ml de macromolécules
- 10ml de micromolécules
- 10ml de fer
- 10ml de vitamines

Nous avons ajouté au milieu 30g/l de saccharose et on le solidifier par 7gr d'agar agar. Le pH du milieu est ajusté entre 5,6 à 5,8.

Le milieu de culture versé dans les tubes à essai à raison de 20 ml par tube est autoclavé à 120°C pendant 20mn, sous une pression de 1 Bar.

Sous hotte à flux laminaire stérile, on met dans chaque tube une à deux graines préalablement désinfectées. Les tubes sont placés dans la chambre de culture à une température de 26 ± 1 °C et une photopériode de 16 heures lumière et 8h obscurité.

II.2.4 Activation des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont conservées à l'obscurité dans le milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) à une température de - 4°C. L'activation des bactéries, consiste à les ensemercer sur un milieu de culture YEM solide, préparé selon la formule citée dans le **tableau 1**. Les boîtes de pétri sont mises ensuite en incubation à l'obscurité, à une température de 27 ± 1 °C pendant 48 à 72 heures. Une partie des bactéries activées sera utilisée pour la préparation des suspensions bactériennes, l'autre partie va être conservée pour les prochaines manipulations.

Après leur activation, les souches bactériennes sont ensemençées dans un milieu de culture YEM liquide de pH7. Les bactéries en suspension sont mises en incubation pendant 72 heures dans un incubateur agitateur (80 tour/mn) à l'obscurité et à une température de 27 ± 1 °C.

Tableau 1. Composition chimique du milieu de culture YEM (VINCENT, 1970)

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

II.2.5 Transformation par *l'Agrobacterium rhizogenes in Vitro*

II.2.5.1 Infection et Co-culture plante-bactérie

L'infection et la co-culture sont réalisées en suivant le protocole proposé par AMDOUN et al. (2010). Un mois après l'ensemencement des graines de *Datura stramonium*, les vitrosemis sont suffisamment développés. Le milieu de culture sur lequel sera effectuée l'infection, est préparé 24 heures avant, en présence de 250mg/l de Céfotaxime (antibiotique destiné à empêcher le développement des bactéries sur le milieu de culture).

L'infection est réalisée en présence des deux souches bactériennes mises en suspension dans l'incubateur depuis 72 heures.

II.2.5.2 Induction des chevelus racinaires

Cette opération est réalisée par l'infection des explants par dépôt selon le protocole d'AMDOUN (2010). A partir de la suspension bactérienne mise en incubation pendant 72 heures, nous inoculons à l'aide d'une seringue, deux à trois gouttes (0,2µl) que nous déposerons au niveau de la surface libre des fragments. La concentration de la suspension bactérienne utilisée est $DO_{600} = 0,5$ (LADRRA, 2006).

Notre travail est effectué par l'infection des explants en présence des deux souches bactériennes A4 et 15834. Afin de mettre en évidence l'effet des souches bactériennes sur l'induction du chevelu racinaire, nous avons utilisé trois types d'explants : fragments d'hypocotyles (0,5 à 1cm de longueur), fragments des tiges (1cm de longueur) et des feuilles, qui sont prélevés sur des vitrosemis de *Datura stramonium* âgés d'un mois. Les fragments (tige et hypocotyle) sont déposés selon une polarité inversée.

De ce fait, l'induction du chevelu racinaire est réalisée par l'étude de l'effet de six traitements (2 souches bactériennes x 3 types d'explants). D'après AMDOUN (2010), le repiquage des explants infectés sur milieu frais B5 (GAMBORG *et al.*, 1968) (**annexe 3**) est nécessaire jusqu'à l'apparition des racines transformées.

II.2.5.3 Co-culture plante -bactérie

Les racines issues de la transformation présentent une meilleure croissance sur le milieu B5 (annexe 3) que sur le milieu MS, notre choix s'est donc porté sur le milieu B5.

Les explants infectés (à raison de 4 par boîte de pétri) sont donc cultivés sur le milieu B5, sans régulateur de croissance, contenant 250 mg/l de Céfotaxime.

La Co-culture est réalisée dans l'obscurité et à $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Les observations sont notées chaque semaine.

II.2.6 Isolement des lignées racinaires transgéniques

Selon HARFI *et al.* (2011) et AMDOUN (2010), les racines transgéniques qui apparaissent sur les explants infectés sont excisées lorsqu'elles atteignent environ 2cm de longueur puis transférées sur milieu solide contenant l'antibiotique de sélection. Des repiquages sur des milieux contenant de moins en moins d'antibiotique sont nécessaires.

Après 25 jours de l'opération de transformation génétique, nous avons excisé les racines transgéniques en portions de 2 cm non ramifiées et re-cultivés chacune sur un milieu B5

solide sans hormone, contenant 125 mg/l de Céfotaxime afin d'éliminer les bactéries qui accompagnent éventuellement ces racines. Les boîtes de pétri sont mises à l'obscurité à $26 \pm 1^\circ\text{C}$. En parallèle, nous avons excisé des racines non transgéniques que nous avons transférées sur le milieu B5 solide contenant 125mg/l de Céfotaxime; ces racines vont servir de témoin.

II.2.7 . Sélection des lignées racinaires performantes

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

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

- Vitesse moyenne de croissance des racines (exprimée en cm/jour) ;
- Longueur moyenne totale après 20 jours de culture (exprimée en cm) ;
- Importance des ramifications (évaluation visuelle) ;

Les lignées racinaires sélectionnées sont cultivées sur milieu liquide B5 sans antibiotique, ni hormone et mis sous agitation, dans l'obscurité. Utilisant des fioles de 125ml à raison de 20ml du milieu B5 dans chaque fiole.

Les lignées racinaires sélectionnées mesurent ($\approx 4\text{cm}$). Dans chaque fiole, quatre racines sélectionnées sont cultivées pendant 21 jours (AMDOUN., 2010).

Dans notre travail 2 lignées ont été retenus à savoir N1 pour les explants infectés par la souche 15834 et M2 pour les explants infectés par la souche A4.

II.2.8 Elicitation par le stress salin

L'essai de l'élicitation par le stress salin est utilisé pour confirmer l'hypothèse que le stress salin fait augmenter la quantité de l'hyoscyamine. IL est réalisé sur le milieu B5 (GAMBORG *et al.*, 1968) liquide additionné de 30 g/l de saccharose. Le pH est ajusté entre 5,6 et 5,8. Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave (120°C pendant 20 mn) dans des Erlenmeyer de 250 ml à raison de 50 ml de milieu de culture par Erlenmeyer (fig. 7). L'inoculum primaire est constitué des extrémités de trois racines transgéniques d'environ 3 cm de longueur.

L'élicitation est effectuée sur la lignée racinaire sélectionnée (N1). L'étude est réalisée avec une meilleure concentration (2 g/l) de CaCl_2 et le meilleur temps de contact de (24 heures) obtenue par HARFI, 2013. 21 jours après la culture sur le milieu liquide, les chevelus racinaire sont récoltés, lavés à l'eau distillés puis séchés dans l'étuve à 50°C pendant 24h.



Figure 7. la morphologie de la lignée N1 traitée par 2 mg /l de CaCl_2 (Gr = X 0,5)

II.3 Extraction des alcaloïdes

Pour l'extraction de l'hyoscyamine, nous avons adopté le protocole de AMDOUN et *al.*, (2009) qui est basé sur le principe que les alcaloïdes se comportent comme des sels dans une solution acide et sont sous forme organique dans une solution basique.

Le protocole d'extraction est le suivant :

- Broyage, dans un mortier, de 50 mg de matière sèche de chevelus racinaires avec une solution acide d' HCl de 0,1N ;
- Agitation du mélange pendant 10 minutes ;
- Filtration ;
- Ajustement du pH à une valeur proche de 10 par une solution d'ammoniac (NH_3) ;
- Addition du chloroforme (CHCl_3) à volume égal (v:v) suivi d'une agitation pendant 10 min ;
- Séparation des deux phases (chloroforme et solution minérale) dans une ampoule à décanter ;
- Répétition des deux dernières étapes (1 fois).

- Mélange des deux phases organiques (les deux solutions du chloroforme), addition d'une pincée de sel anhydre (Na_2SO_4) pour absorber les dernières microgouttelettes d'eau qui restent ;
- Filtration ;
- Évaporation partielle de la solution du chloroforme à l'aide du rotavapor réglé à 80 °C. Dans ces conditions l'évaporation partielle se fait après environ 5 min ;
- Évaporation complète du chloroforme dans un bain marie réglé à 60°C jusqu'à séchage complet.

II.4 Dosage et identification de l'hyoscyamine

Le dosage et l'identification des alcaloïdes des lignées racinaires étudiées sont réalisés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) selon le protocole de HARFI (2009) :

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

La teneur en hyoscyamine des lignées sélectionnées est définie à l'aide de la courbe étalon (figure 8) établie à partir de la transformation des surfaces des pics correspondants à des concentrations en hyoscyamine standards (Annexe 5).

L'appareil de l'analyse est un CHROMPACK CP9002, muni d'un détecteur à ionisation de flamme et équipé d'une colonne capillaire DB1 (L = 30 m, Ø = 0,32 mm externe et 0,25 mm interne) (Figure.10). L'azote est le gaz vecteur et l'hydrogène le gaz de combustion. La température du four (colonne) est réglée à 250°C et celle du détecteur et de l'injecteur à 260°C.

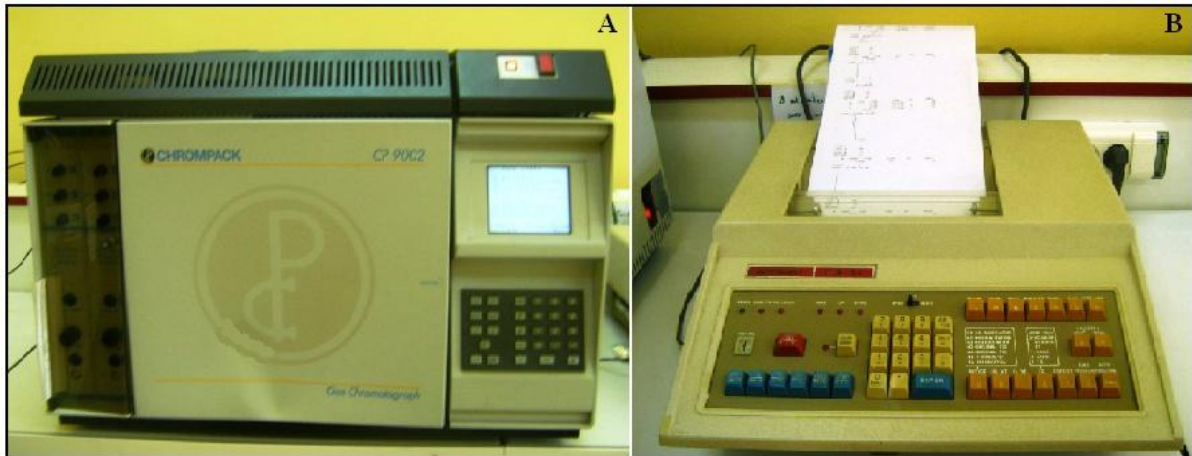


Figure 8. Appareillage du dosage de l'hyoscyamine (CPG)

II.5 Analyse statistique

L'analyse de la variance (ANOVA) suivie quand celle-ci est significative du test de Tukey (classification en groupes homogènes) au seuil de 5% est utilisée pour traiter les résultats obtenus à l'aide du logiciel SPSS version 10.0. Les moyennes suivies de la même (ou les mêmes) lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes.

Les barres sur les graphes représentent les écarts types au seuil de 5%. Les symboles * (5%), ** (1%), *** (0,1%) représentent le niveau de signification.

III. Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

I.1 Germination des graines de *Datura stramonium*

Les premières germinations (Figure 9) sont observées au bout de 4 jours de culture. Le taux de germination obtenu après deux semaines de culture sur milieu MS est de 100%.

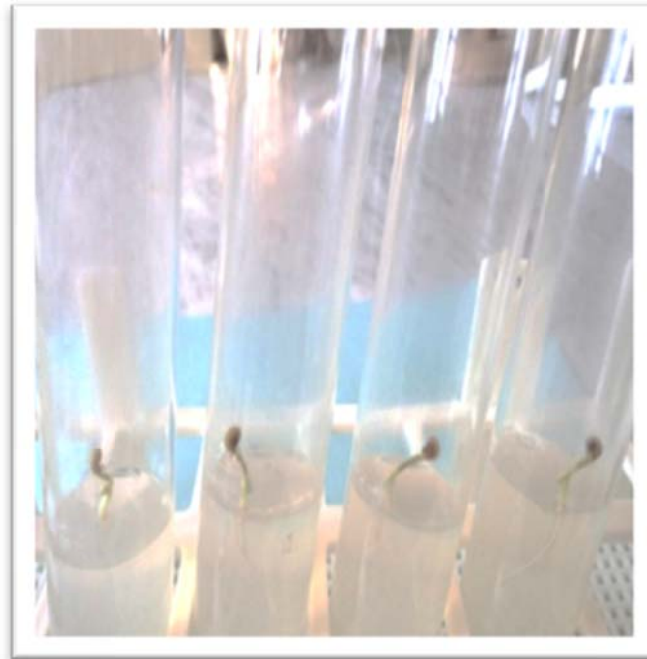


Figure 1. Germination des graines de *Datura stramonium* obtenue après une semaine de semis (Gr : x 0,9)A: Chrompack, B: Intégrateur

Selon KHELIFI-SLAOUI et *al.* (2005), les graines de *Datura* non scarifiées ne germent pas. La faculté germinative peut être améliorée par la scarification (REISCHAMN-BERMAN et *al.*,1989 In AMDOUN, 2003). Ceci montre l'importance de la scarification pour la germination et le développement des vitrosemis chez le *Datura* (KHELIFI-SLAOUI et *al.*,2005).

Le taux de germination que nous avons obtenus rejoignent celui de nombreux travaux réalisés au Laboratoire des Ressources Génétiques et Biotechnologies de l'ENSA : 91,66 % (KHELIFI-SLAOUI et *al.*, 2005), 91,49% (LADRRAA, 2006), 90% (ZAROURI, 2006), et 89,58% (BEKHOUCHE, 2013) pour le *Datura stramonium*.

Sur les 60 graines mises en germination, aucune contamination n'a été enregistrée au cours du développement des vitrosemis, ce qui confirme l'efficacité des protocoles de scarification et de désinfection des graines préconisés et adoptés par KHELIFI-SLAOUI et *al.* (2005) pour cette espèce.

Les vitrosemis (Fig.10) obtenus après deux mois de culture sont destinés à prélever les hypocotyles, les tiges et les feuilles qui serviront à réaliser les transformations génétiques par l'*Agrobacterium rhizogenes*.

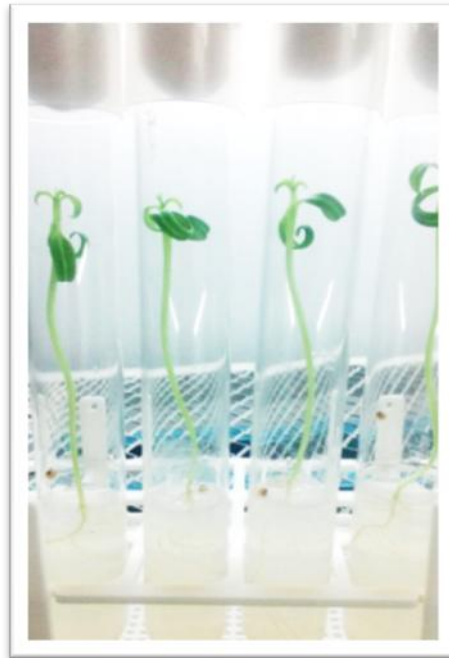


Figure 10. vitrosemis de *Datura stramonium* âgés de 30 jours (Gr : x 0,9)

III.2 Obtention des chevelus racinaires

III.2.1 Taux de réactivité

Au niveau du site d'infection des fragments d'hypocotyles par l'*Agrobacterium rhizogenes* A4 et 1534, le taux de réactivité est de 100%, car après 5 jour d'infection il y a apparition des racines à la base d'hypocotyle ce sont des racines ordinaires (figure 11) ce qui prouve la viabilité de ces explants, nos résultats coïncident avec ceux de HARFI et *al.*(2013) qu'a eu un taux de réactivité 100%.

Pour les fragments de tige infecté par l'*Agrobacterium rhizogenes* A4 et 1534, un taux de réactivités est de 100%, les cellules se différencient engendrant la formation de cals. Les cals sont visibles à partir du 7^{ème} jours après l'infection pour la souche 15834 et au 10^{ème} jour

après l'infection pour A4. De même, tous les explants témoins (non infecter par les bactéries) montrent le développement de cals au niveau des sections.

Par contre les feuilles infectées par les deux souches bactériennes ne montrent aucune réaction avec le milieu de culture (taux de réactivité est nul).



Figure 11. Racine ordinaire issu d'un fragment d'hypocotyle

La transformation d'*Opium poppy* et de *California poppy* par la souche R1000 donne presque le même taux de réactivité ; 92% pour *Opium poppy* et 93% pour *California poppy* (PARK et FACHINI, 2000). La même constatation est faite pour la souche R1200 rolD qui donne un taux de réactivité de 91% pour *Opium poppy* et 92% pour *California poppy*.

III.2.2 Taux d'induction racinaire transgénique

Les racines transgéniques sont observées uniquement chez les fragments de tige (figure12), alors qu'on n'observe aucune induction racinaire chez les fragments d'hypocotyle et les feuilles.

Les résultats obtenus montrent que le taux d'induction racinaire des explants de tige infectés par la souche 15834 est de 55.88%, et il est de 30% par la souche A4. BEKHOUCHE (2013) a obtenu un taux de 52,08% pour *D. stramonium* et 16,67% pour *D. innoxia*.

Lors de nos essais, nous avons obtenu des taux d'induction qui diffèrent d'une souche à une autre, allant de 30% pour la souche A4 jusqu'à 55,88% chez la souche 15834.

Selon DE CLEEN et DE LEY (1981 in DHAKULKAR *et al.*, 2005), Le taux d'induction de chevelu racinaire est fortement influencé par le génotype à infecter. Plusieurs espèces

infectées par la souche A4 présentent des taux d'induction différents, *Holostemma ada-kodien* K (13,52%) (KARMARKAR, 2001), *Torenia forniieri* (55%) (Tao et Li, 2006), et *Salvia officinalis* L (37%) (GRZEGORCZYK et al., 2006).

De plus, les différentes provenances de la même espèce peuvent présenter des réponses différentes à l'induction. En effet, Quatre populations de *Rubiactinctorium*L. agroinfectées par la même souche bactérienne 15834, ont donné différents taux d'induction : 75% pour la population Konya, suivie par Izmir avec 60%, Usak 34% et enfin Bademagaci avec 33% (ECRAN et TASKIN, 1999).

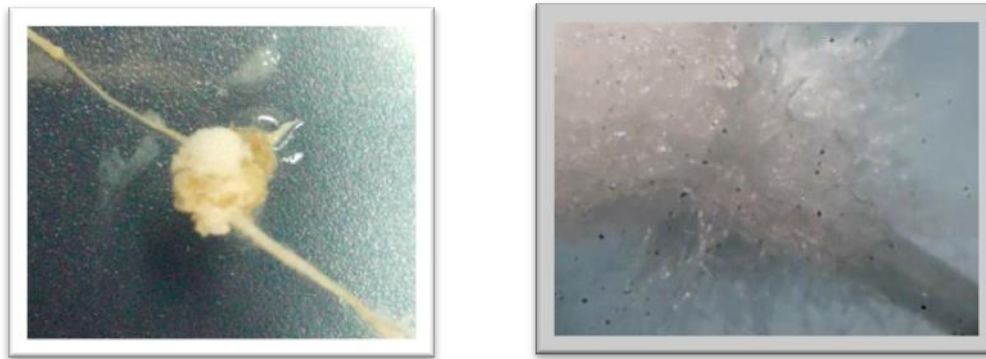


Figure 12. Induction des racines transgéniques. Gauche : Racine émergeant du site d'inoculation (Gr = 2,54), droite : morphologie du chevelu racinaire (Gr = 7,52)

III.2.3 Temps moyens d'apparition de la première racine

Le tableau 2 illustre les résultats des temps moyens d'apparition de la première racine sur les explants de *Datura stramonium* inoculées par l'agrobactérie A4 et 15834.

Tableau 2. Temps moyens d'apparition de la première racine chez de *Datura inoculé par A4 et 15834* après 30 jours de culture

Agrobactérie	Temps moyens d'apparition de la 1ère racine (jours)
A4	20
15834	17

Nos résultats montre que les fragments de tiges infectées par la souche 15834 ont met moins de temps (17jr) pour induire les racines transgénique par rapport aux fragments infecté par la souche A4 (20jr).

MARTINS *et al.* (2003) signalent que pour les explants de *Vitis vinifera* infectés par la souche A4, les racines commencent à apparaître 8 jours après l'infection. BANERJEE *et al.* (1998) indiquent que chez *Valeri anawallichii* DC, les racines commencent à se former 18 à 20 jours après l'infection alors que chez le *Datura metel* et *Duboisia*, les racines n'apparaissent qu'après 6 semaines de l'infection (MOYANO *et al.*, 1999). Selon VALLET (1996) après 10 à 25 jours d'infection de *Datura innoxia* par l'*Agrobacterium rhizogenes*, les racines apparaissent au niveau du site d'inoculation.

III.2.4 Nombre moyen de racines par explant

Le nombre moyen de racines par explant pour la souche 15834 est de 1,75 racines/explant et de 1.25 racines/explant pour la souche A4.

Chez *Opium poppy* le nombre de racines induites par explant est de 4,1 racines ; pour *California poppy* il est de 4,6 racines par explant (PARK et FACHINI, 2000). Cependant, AMDOUN *et al.* (2006), rapportent que le nombre de racines transformées produites pour l'ensemble des explants de *Datura innoxia* et *Datura stramonium* ne dépasse pas 3 racines par explant. Nos résultats rejoignent parfaitement ces constatations.

Ces résultats montrent que la réponse des *Datura* à l'induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* varie considérablement en fonction de l'espèce, de la provenance et de la souche bactérienne utilisée.

III.3 Sélection des lignées racinaires performantes

Les racines transformées présentent généralement une bonne croissance. Cependant, une partie est contaminée et l'autre partie entre elles sont caractérisées par une faible croissance et/ou par la formation de cals. Les racines exprimant ce type de phénotype sont systématiquement éliminées. Et celles qui présentent une vitesse de croissance très importante ainsi qu'un développement jugé intéressant sont retenues (fig.14). Ainsi sur les multiples lignés de départ de 2 lignées jugées performantes ont été sélectionnées pour la suite de travail.

MALDONADO-MENDOSA *et al.*, (1993) ont mis en évidence une grande variabilité génétique en terme des taux de croissance et des contenus alcaloïdiques entre les lignées racinaires de *D. stramonium*. Ceci serait dû au fait que le site d'intégration du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante hôte ainsi que le nombre de copies insérées sont complètement soumis au hasard. Il existe toujours des différences considérables en matière du taux de

croissance et d'accumulation de métabolites secondaires parmi les lignées racinaires issues d'un même événement de transformation (ZHI-BU et MIN, 2006 ; GEORGIEV *et al.*, 2007).

Ainsi, les 2 lignées racinaires retenues (N1 et M2) présentent les meilleures biomasses. La figure 13 illustre la morphologie des lignées racinaires retenues après 20 jours de culture sur milieu de culture B5 semi-solide.



**Figure 13. Aspect morphologique des lignées racinaires retenues
(Droite: N1 et gauche : M2)**

III.4 La teneur en hyoscyamine

La teneur en hyoscyamine des racines ordinaire, des lignées sélectionnées N1 et M2 et des lignées N1élicitée par 2 g de CaCl₂ est définie à l'aide l'équation de la régression linéaire (figure 14) établie à partir de la transformation des surfaces des pics (Annexe 5). Les teneurs en hyoscyamine varient de 6.60mg/g MS à 276.98 mg/g de M.S.

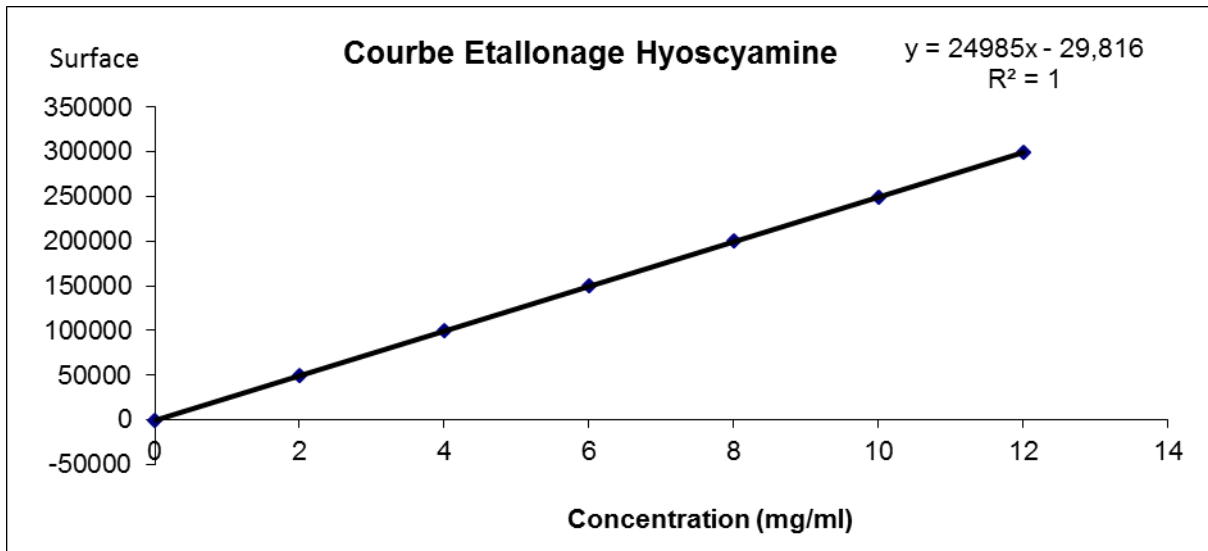


Figure 14. Courbe d'étalonnage de la CPG

L'analyse de la variance ($F = 3.49$, $ddl = 3$, P^{****}) a révélé un effet très hautement significatif entre le type de racine et la teneur en hyoscyamine (Annexe 4). Le teste LSD et tukey (0.05 %) distingue 4 groupes homogènes (tableau 3).

Le tableau 3 montre que la teneur en hyoscyamine de la racine non transformée (6.63mg/g MS) est inférieure aux teneurs enregistrées avec les lignées transformée (M2=29.70mg/g MS ET N1 57.35mg/G de MS).

Les travaux de HARFI (2009), BELABASSi (2010) et BEKHOUCHE (2014) ont montré que les racines transformées possèdent des teneurs supérieures par rapport aux racines non transformé, les taux enregistré par ses auteurs varient entre 5 et 16 mg/g MS. Nos résultats révèlent des teneurs supérieures à celle obtenu par les auteurs précédents.

Tableau 3. Teneurs en hyoscyamine

Echantillons	Surface	Concentration mg/50mg de M.S.	Concentration mg /g de M.S.
Normale	8253	0,331	6,630 ^D
M2	37074	1,485	29,701 ^C
N1	71615	2,867	57,350 ^B
N1 élicité par 2mg/l CaCl2	345992	13,849	276,984 ^A

Les résultats du tableau 3 révèlent que les teneurs en hyoscyamine varient en fonction de la souche bactérienne. Plusieurs études démontrent que le contenu en hyoscyamine des *Datura sp* varient considérablement en fonction de la souche bactérienne utilisée (AMDOUN et al., 2006). Les résultats de notre expérimentation rejoignent ceux obtenus par les auteurs précédents. En effet, La teneur en hyoscyamine obtenue par la lignée N1 est plus élevée que celle obtenue par la lignée M2.

Par ailleurs la lignée N1 élicitée par 2mg/l de CaCl₂ présente une teneur très élevée (environ 4 fois plus) par rapport à la lignée N1 non élicitée.

L'élicitation induit l'expression de gènes responsables de la biosynthèse de métabolites secondaires (ROBBERTS et SHULER, 1997) en particulier ceux impliqués dans la défense des plantes tels que les alcaloïdes (HERBERT, 2001). De nombreux éliciteurs abiotiques (sels inorganiques) tel que le chlorure de calcium, et le chlorure de potassium provoquent l'accumulation des métabolites secondaires dans les cellules des plantes (AJUNGLA et al., 2009).

AJUNGLA et al., (2009) ont exposé des racines de *Datura metel* L au chlorure de calcium. Le traitement des cultures par 15 mM de CaCl₂ (= 0,8 g/l) augmente l'accumulation de l'hyoscyamine de 2 à 3 fois par rapport au témoin. (PITTA ALVAREZ et al, 2000).

Nos résultats rejoignent ceux obtenus avec les auteurs cités ci-dessus, d'où une augmentation de la teneur en hyoscyamine d'environ 4 fois par rapport à la lignée non élicitée.

Conclusion

Conclusion

Les cultures cellulaires sont considérées comme une alternative aux procédés agricoles pour produire des substances chimiques actives. Cependant certains systèmes cellulaires (suspensions cellulaires, cals) présentent l'inconvénient d'être génétiquement instables et peu productifs en métabolites secondaires. Les cultures organisées, et particulièrement les cultures de racines, peuvent apporter une contribution significative à la production des métabolites secondaires. Les racines neoplasiques produites suite à l'infection par *Agrobacterium rhizogenes* sont caractérisées par un taux de croissance élevé, une stabilité génétique et un développement continu dans des milieux de cultures sans hormones. Les cultures de chevelus racinaires offrent l'avantage d'améliorer la production et la productivité des métabolites secondaires utilisés en pharmacologie (SRIVASTAVA S et SRIVASTAVA a., 2007).

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, notre travail a porté sur l'induction des chevelus racinaires d'une espèce du genre *Datura* (*Datura stramonium L*) par deux souches d'*Agrobacterium rhizogenes* (A4 et 15834) ainsi que l'extraction de l'hyoscyamine à partir des lignées sélectionnées.

Les résultats obtenus montrent que le *Datura stramonium L* présente non seulement un taux de germination très intéressant (100% après 4 semaines de culture), mais aussi une meilleure réponse vis-à-vis de la transformation par les souches A4 et 15834 de l'*Agrobacterium rhizogenes*. Le taux d'induction racinaire varie de 30% à 55.88% obtenus respectivement avec les souches A4 et 15834.

Par ailleurs, les meilleurs teneurs en hyoscyamine ont été obtenus avec les lignées racinaires transformées (La lignée M2=29.79mg/g de M.S ; La lignée N1=57.35mg/g de M.S) par rapport à ceux obtenus avec les racines non transformées (6.63mg/g de M.S).

L'élicitation avec 2 g/l de CaCl₂ pendant un temps de contact de 24 heures s'avère est très efficaces. Elle permet une amélioration de la teneur en hyoscyamine d'environ 182% (276.984 mg/g de M.S) par rapport au témoin (57.35 mg/g de M.S).

Ainsi, dans la perspective d'approfondir ce travail, il serait judicieux d'étudier l'effet d'autres facteurs, à savoir :

- Tester d'autres éliciteurs salins ;
- Tester d'autres éliciteurs abiotiques tel que : la température, la lumière, la combinaison de ces éliciteurs ;
- Tester de nouveaux éliciteurs biotiques tel que : les éliciteurs bactériens ou les éliciteurs fongiques ;
- Combinaison d'éliciteurs biotiques et abiotiques.

Il serait souhaitable d'utilisée le *datura stramonium* dans le cadre de lutte biologique contre plusieurs ravageurs tel que les acariens et les aleurodes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Ajungla L., Patil P.P., Barmukh1 R.B., Nikam T.D., 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Daturametel* L. Indian Journal of Biotechnology, Vol. 8, p.p. :317-322.
 - Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Benyoussef E.-H., Dao Vu Thi, Assaf-ucrocq C., Gontier E., 2009. Influence of minerals and elicitation on *Daturastramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the in vitro biochemical response. Plant Science, Vol. 177, p.p. : 81–87.
 - Amdoun R., Khelifi L., Zarouri B., Amroun S. et Khelifi-Slaoui M., 2006. Production de chevelus racinaires par transformation génétique *in vitro* de deux espèces de *Datura*. Biotechnologie végétale. Ed. Khelifi. Alger. p.p. : 7-9.
 - Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Amroun S., Khelifi L., 2005a. Ressources génétiques des *Datura* en algérie. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Alger, Ed. Khelifi, p.p. : 212 - 213.
 - Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Amroun S., Khelifi L., 2005b. L'éllicitation: Outil incontournable pour optimiser la production des alcaloïdestropaniques in vitro. Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales. Alger, Éd. Khelifi. p.p. : 156-157.
 - Amdoun R., 2003. Contribution à l'amélioration de la production d'alcaloïdes tropaniques par des apports calciques chez *Datura stramonium* L. Thèse magistère. Université Saad Dahleb, Blida, Faculté des sciences agrovétérinaires et biologiques, 70p.
 - AMDOUN R., 2010. Optimisation de la production par voie biotechnologique des alcaloïdes tropaniques à partir de chevelus racinaires de *datura stramonium* L. : approche par modélisation mathématique. Thèse de doctorat, ENSA, Alger, 77p.
 - Bakiri N., 2007. Prospection de la diversité génétique et quantification des alcaloïdes chez quelques provenances algériennes de *Datura stramonium* L. Mém. Ing. Agro., Inst. Nat. Agro., El harrach , 83P.
- Banerjee S., Rahman L., Uniyal G.C. et Ahuja P.S. 1998. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy root cultures of *Valerianawallichii* DC. Plant Science, Vol.131, p.p. : 203-208.
- BEKHOUCHE M., 2013 Effet de deux éliciteurs salins sur la production en hyosyamine de racines transgéniques de trois espèces de *Datura* sp. Mém. master2. Agro. Université khemismiliana , 90p.

- Belabbassi O., Benouaret R., 2009. Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes à partir de chevelus racinaires : quelques provenances locales de *Datura stramonium* L. Mém. Ing. Agro., Inst. Nat. Agro., El harrach, 58P.
- Belaskri A., 2006. Incidence de la maladie du Crown gall de l'eucalyptus dans les pépinières forestières de l'ouest algérien. Thèse magister. Faculté des sciences, Uni. Abou BekrBelkaid, Tlemcen, 101P.
- Benhizia Z., 1989. Contribution à l'étude d'une plante médicinale algérienne, *Datura stramonium* L. Th. magistère. INA, Alger, 68 P.
- Bianchini F., Corbitta F., 1975. Atlas des plantes médicinales. Edition Fernand Nathan. Paris. 120P.
- Bianchini F., Pantano A C., 1986. Guide vert des plantes et des fleurs. Édition Solar.125P.
- Bouzar H., 1983. A servey of Agrobacterium strains associated with Georgia pecan trees and an immunological study of the bacterium. Thèse Master of Science. Oregan state university. USA. 67 p.
- Bruneton J., 1987. Elément de phytochimie et pharmacognosie, Paris : Lavoisier-Tech. & doc. 584P.
- Bruneton J., 1995. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Ed Lavoisier. Paris, 915P.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie: Physiologie, plantes médicinales. Ed. Rev. et Augm.
- Burgot G. et Burgot J. L., 2006. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et application. Ed Lavoisier, 2^{ème} édition. Paris, 319P.
- Casse F., Breitler J.C., 2001. OGM : description, méthodes d'obtention, domaines d'application. Ed. France agricole. Paris. 166P.
- Chaunu M., 2009. Dépistage de cannabis dans la salive : Etude comparative avec les autres matrices biologiques. Thèse Doctorat. Faculté de pharmacie, Uni. Rennes 1, 132P.
- Chriqui D., 1998. Biotechnologies végétales : Génie génétique. Laboratoire CEMV – Université P. & M. Curie, Paris VI, 84 P.
- Chupeau Y., 2001. Les raffinements sexuels d'une bactérie du sol...au service du génie génétique. Médecine/Sciences, Vol.17, p.p. : 856-866.
- Cieri U.R., Bertrand R., Choi K.K., Gagnon J., Krol P., Latzo P., Lau D., Melendez J., Pyramides G., Sen S., Steible D., Weigand J., 2003. Determination of atropine (hyoscyamine) sulfate in commercial products by liquid chromatography with UV absorbance and

fluorescence detection: Multilaboratory study. Journal of AOAC international vol. 86, n. 6, p.p. : 1128 – 1134.

- Créte P., 2006. La transgénèse végétale. Université de la méditerranée, p.p. : 1-19.
- Csapody V., 1961. Magyarországkultúrflórájá. Budapest, 92 P.
- Dambri M., 1998. Évaluation de la composition alcaloïdique des plantes de *Datura innoxia* Mill et *Datura tatula* L poussant à l'état sauvage. Thèse. Ing. Sc. Agr. Blida. 81P.
- Davet P., 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA Paris. 383 p.
- Dessouky M. M. , Taha H. S., El-Bahr M. K., 2001. Enhancement of alkaloids production in suspension cultures of *Datura stramonium* L. and *Datura metel* L. Egypt. 7p.
- Dhakulkar S., Ganapathi T.R. Bhargava S. Et Bapat V.A., 2005. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. And production of verbascoside in hairy root. Plant science, Vol. 169, p.p. : 812-818.
- DiCosmo F, Quesnel A, Misawa M., Tallevi SG., 1987. Increased synthesis of ajmalicine and catharanthine by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* in response to fungal culture-filtrates. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 14, p.p. :101–106.
- Drâger B., 2002. Analysis of tropane and related alkaloids. Journal of chromatography (Review), Ed. Elsevier, Vol. 987, p.p. : 1-35.
- Ducroq C., 1994. Genetic transformation in medicinal plant : *Datura innoxia* Mill., by *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* and contribution to the study of secondary metabolites. Th. doctorat de 3ème cycle en physiologie végétale approfondie, Paris, 72 P.
- Duran-Patron R., O'Hagan D., Hamilton J. T., Wrong C. W., 2000. Biosynthetic studies on the tropane ring system of the tropane alkaloids from *Datura stramonium*. Physiology, Vol. 53, p.p. : 777-784.
- Ecran A.G. et Taşkin M., 1999. *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root formation in some *Rubiatinctorum* L. population Grown in Turkey. Tr. J. of Botany, Vol. 23, p.p. : 373-377.
- El Bazaoui A., Stambouli A., Bellimem M.A., Soulaymani A., 2009. Détermination des alcaloïdes tropaniques des graines du *Datura stramonium* L. par GPC/SM et CL/SM. Ann. Toxicologie analytique, vol 4, n. 21, p.p. : 183-188.
- Facchini P. J., 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: Biotechnology, cell biology, molecular regulation and metabolic engineering. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, p.p.: 29-66.

- 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*, Vol. 1, n. 2, p.p. : 59-74.
- Flores H.E., Vivanco J.M., Loyola-Vagas V.M., 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends plant sci*, Vol. 4, p.p. : 220-226.
- Funka C, Güglera K., Brodeliusa P., 1987. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry*, Vol. 26, p.p. : 401–405.
- Gadzovska S., Maury S., Hano C., Lamblin F., Spasenoski M., Joseph C., Hagege D., 2004. Influence de différents éliciteurs sur la production de métabolites secondaires de divers explants d'*Hpericum perforatum* L. Culture in vitro. Acte du 17^{ème} colloque biotechnologique. France, 72P.
- Gamborg O.L., Murashige T., Thorpe T.A., Vasil, I.K., 1968. Plant tissue culture media. *In Vitro*, n. 12, p. 473.
- Ge, X. et Wu, J., 2005. Induction and potentiation of diterpenoid tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by betaaminobutyric acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 68, p.p. :183–188.
- Gelvin, S. B., 2003. Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *Trends in Biotechnology*, Vol. 21, n. 3, p.p. : 95-98.
- Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T., 2007. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *App Microbiol Biotechnol*. 74: 1175-1185.
- Giri A., Narasu M.L., 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, vol. 18, p.p. : 1 – 22.
- Gontier E., Sangwan B.S., Barbotin J.N., 1994. Effects of calcium, alginate and calcium alginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of stable suspension cell line of *Daturainnoxia* Mill. *Plant Cell Rep*, Vol. 13, n. 13, p.p. : 533-536.
- Goullé JP., Pepin G., Dumestre-Toulet V. Et Lacroix C., 2004. Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. 34p.
- Griffin, W.J., Lin, G.D., 2000. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, vol. 53, p.p.: 623–637.
- Grzegorzcyka I., Krolickab A., Wysokin´Skaa H., 2006. Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Z. Naturforsch*, Vol. 61, p.p. : 351-356.

- Guignard J. l., 1979. Abrégé de biochimie végétale, 2ème édition. Maisson, Paris, p.p. : 217-229.
- 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, vol. 9, p.p. : 341-346.
- Harfi B., 2009. Induction de chevelus racinaires par *Agrobacteriumrhizogenes* chez *Datura sp* : Essai d'optimisation de la prodcution d'alcaloïdes. thèse magister. Sci. Agro., Inst. Nati. Agro., El Harrach, 109P.
- Harfi B., Khelifi-Slaoui M., Zaoui D., Benyammi R., Belabbassi O., Khelifi L., 2011. Effect of Culture Medium on Hyoscyamine Production from Four *DaturaSp* Hairy Roots. Advances in Environmental Biology, Vol. 5, n. 5, p.p. : 1023-1030,
- He C.Y., Hsiang T., Wolyn D.J., 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusariumoxysporum*. Plant Pathol., vol. 51, p.p. : 225–230.
-
- Heby O., 1981. Role of polyamine in the control of cell proliferation and differentiation. Springer- verlag, Vol. 19, p.p. : 1-20.
- Herbert R.B., 2001. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. Nat. Prod. Rep, Vol. 18, p.p. : 50-65.
- Holden PR, and Yeoman MM., 1994. Variation in the growth and biosynthetic activity of cloned cell-cultures of *Capsicum frutescens* and their response to an exogenously supplied elicitor. Plant CellTissOrganCult, Vol. 38, n. 1, p.p. : 31–37.
- Hopkins W.G., 2003. Physiologie végétale. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514P.
- Houmani Z., 1999. Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Th. Doctorat, INA, Alger, 124 P.
- Houmani Z., Cosson L., 2000. Quelques espèces algériennes à alcaloïdes tropaniques. Ethnopharmacologie, Ed. Erga, p.p. : 205 - 219.
- Houmani Z., Cosson L., Corbineau F., Com D., 1994. Etude de la teneur en hyoscyamine et en scopolamine d'une population sauvage de *Datura stramonium* L. en Algérie. Acta. Bot. Gallica, vol. 141, n. 1, p.p. : 61 - 66.
- Howard E., Citovsky V., 1990. The emerging structure of the *Agrobacterium* T-DNA transfer complex. BioEssays, vol. 12, p.p. :103-108.

- Hutcheson S.W., 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 36, p.p. : 59–90.
- Iserin P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed. Larousse. 334P.
- Izouine K., 2001. Amélioration de la production d'alcaloïdes tropaniques par culture en irriguée chez *Datura innoxia* Mill Spontané. These. Ing. Agr, Blida. p121.
- Kang S. M., Min J.Y., Park D. J., Jeon M. J., Song H. J., Heo C. M., Kim H. G., Yang J. K., Lee C. H., Karigar C. S., Choi M. S., 2010. Potassium chloride elicits enhancement of bilobalide and Ginkgolides production by *Ginkgo biloba* cell cultures. *Forest Science and Technology*, Vol. 6, n. 2, p.p : 49-54.
- Karmarkar S.H., Keshavachandran R., Nazeem P.A., Girija D., 2001. Hairy root induction in *Adapathiyana (Holostemmaaada-kodien k. SCHUM.)*. *Journal of Tropical Agriculture*, Vol. 39, p.p. :102-107.
- Khelifi L., Harfi B. Amdoun R., Morsli A., Zaoui D., Khelifi-Slaoui M., 2009. Effets de l'élicitation et de la perméabilisation sur la biomasse et le rendement en hyoscyamine des chevelus racinaires de *Datura sp.* *Revue des Régions Arides – Numéro spécial – 24 (2/2010) Actes du 3ème Meeting International. Jerba (Tunisie)*.
- Khelifi L., Zarouri B., Amdoun R., Harfi B., Morsli A., Khelifi-Slaoui M., 2011. Effects of Elicitation and Permeabilization on Hyoscyamine Content in *DaturaStramonium* Hairy Roots. *Advances in Environmental Biology*, Vol.5, n. 2, p.p. : 329-334.
- Khelifi-Slaoui M., Khelifi L., Rezine R., Amdoun R., Morsli A. et Amroune S., 2005. Embryons somatiques et bourgeons néoformés induits sur explants issues de vitrosemis de *Datura stramonium* L.. *Biotechnologies végétales*. Ed. Khelifi. Alger, n. 0, p.p.: 33-36.
- Kim Y., Wyslouzil B E. Et Weathers P.J., 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro Cell. DevPlant*, Vol. 38, p.p. : 1-10.
- Kim Y., Wyslouzil B E. et Weathers P.J., 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro Cell. Dev.-Plant* 38: 1-10.
- Kinsara A.M., Seif El Nasr M.M., 1994. L'Organisation et la production des alcaloïdes dans les tissus de culture de *Datura innoxia* Mill. *Oum el quraauniversitymekkahjkau. Sci*, vol. 6, pp : 5-15.
- Komaraiah P., Reddy G. V., Reddy P. S., Raghavendra A. S., Ramakrishna S. V., Reddanna P., 2003. Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor-treated hairy root cultures of *Solanumtuberosum*. *Biotechnol. Lett*, Vol. 25, p.p. : 593 – 597.

- Kovalenko P.G., Maliuta S.S., 2003. An effect of transformation by Ri-plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production. *Ukranicabioorganicaacta*, Vol. 1, n. 1, p.p. : 50-60.
 - Kumar V., Sharma A., Prasad B.C.N., Gururaj H.B., Ravishankar G.A., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electronic Journal of biotechnology* , Vol. 9, n. 4, p.p. : 349-357.
 - Ladraa N., 2006. Induction des chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura sp.* Mem. Ing. Sc. Agr. INA, 61 P.
 - Lambert C., Thomas G., Leger D., Pamboukdjian N. et Tepfer D., 1988. Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénése d'arbres fruitiers. 8ième colloque sur les recherches fruitières-Bordeaux Ed. INRA-CTIFL , p.p. :73-84.
 - Lanoue 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, p.p. : 722-731.
 - Lee O.S., Kang Y.M., Jung H.Y., Min J.Y., 2004. Enhanced production of tropane alkaloids in *Scopoliaparviflora* by introducing the PMT gene. *In vitro cellular & developmental biology*, vol. 41, n. 2, p.p. : 167 – 172.
 - Makkar H.P.S.; Siddhuraju P., Becker K., 2007. *Plant Secondary Metabolites: methods In Molecular Biology*. Ed Humana Press. 130P.
 - Maldonado-Mendoza I.E., Ayora-Talavera T. et Loyola-Vargas V.M., 1993. Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*: Characterization and stability of tropane alkaloid production during long periods of subculturing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol.33 p.p. : 321-329
 - Martins T.M., Domingos A., Novo C. Et Lourenço L., 2003. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on in vitro rooting of *Vitis vinifera*. *Vitis*. 42. 3 : 159- 161.
 - Mauro N.M., 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) camptothécine. Th. Doctorat, université Joseph Fourier – GRENOBLE 1, 186P.
 - Montesano M., Brader G., Palva E.T., 2003. Pathogen driven elicitor: searching for receptors in plants. *Mol Plant Pathol*, Vol. 4, p.p. : 73-79.
- Morsli A., 2013. Caractérisation de la diversité génétique de quelques espèces de *Datura L.* en Algérie, Th. Doctorat, UMM-Tiziouzu, 117 P.

- Moyano E., Fornaleb S., Palazon R.M., Cusido M., Bonfilla M., Morales C., Pinol M.T., 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry*, Vol. 52, n. 7, p.p. : 1287-1292.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, n°15, p.p.: 473 - 497.
- Namdeo A.G., 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Phcog. Rev*, vol. 1, p.p.: 69-79.
- Palazón J., Cusidó R. M., Bonfill M., Mallol A., Moyano E., Morales C., Piñol M.T., 2003. Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. *Plant Physiol. Biochem*, Vol. 41, p.p. : 1019–1025.
- Palazón J., Navarro-Ocaña A., Hernandez-Vazquez L., Mirjalili M.H., 2008. Application of Metabolic Engineering to the Production of Scopolamine. *Molecules*, vol. 13, p.p.: 1722-1742.
- Paris M. et Hurabielle M., 1981. *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) : généralités monographie. Première partie : plantes à glucides (holosides- hétéroside), à lipides, à huile, à protides et à alcaloïdes.* Ed. Masson. Paris, 339P.
- Paris M. et Moyse H., 1991. *Les solanacées médicinales. Matière médicale. 3ème édition.* Masson et Cie édit. Paris.
- Park S-U. et Facchini P.J., 2000. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Opium poppy, *Papaversomniferum* L., and California poppy, *Eschscholziacalifornica* Cham., root cultures. *Journal of experimental botany*, Vol. 51, n. 347, p.p. : 1005-1016.
- Pelikan W., 1986. *L'Homme et les plantes médicinales. Tome I. Centre triades.* Paris. p.p. : 193-196.
- Pinnol M.T., Palazon J., Cusido R.M. 1999. Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Daturastramonium* hairy root. *Plant Science*, Vol. 141, p.p. : 41-49.
- Pitta_Alvarez S.I. , Spollansky T.C., Giulietti A.M., 2000. Scopolamine and hyoscyamine production by hairy root cultures of *Brugmensiacandia*: Influence of calcium chloride, hemicellulase and theophylline. *Biotechnology Letters*, Vol. 22, p.p. : 1653-1656.
- Poletti A., 1988. *Fleurs et plantes médicinales.* Ed. Délachaux et Neistlé S.A. Paris, 222 P.
- Poly G., 2003. *Biochemical targets of plant bioactive compounds: A pharmacological reference guide to sites of action and biological effects.* Ed. CRC Press. p847.

- Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des zones désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS. Paris. 1170P.
- Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T., 2003. Elicitation of plant and microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol.37, p.p.:91-102.
- Rahimi K., Haghbeen K., Marefatjo J., Jazii F.R., Sheikhan R., 2008. Successful production of hairy root of *Valerianasisymbriifolium* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Biotechnology*, no. 2, vol. 7, p.p.: 200-204.
- Ramadan M.F., Zayed R., El-Shamy H., 2007. Screening of bioactive lipids and radical scavenging potential of some solanaceae plants. *Food Chemistry*, vol. 103, n. 3, p.p. : 885 - 890.
- Raout G.R., Samantary S., Das P., 2000. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology advances*, Vol. 16, p.p. : 91-120.
- Roberts P., Shuler M.L. (1997). Large-scale plant cell culture. *Current opinion in biotechnology*, Vol. 8, p.p. : 154-159.
- Roeder V., 2006. Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune *Laminariadigitata*. Th. Doctorat, Université de Rennes 1, 264P.
- Rossignol J.L., Berger R., Deutsch J., Fellous M., Lamour-Isnard C., Ozier-Kalogeropoulos O., Picard M., De Vienne D., 2004. Génétique : gène et génome. Ed. Dunod, Paris, 231 p.
- Rouessac F. et Rouessac A., 2005. Analyse chimique: Methodes et techniques instrumentales modernes. Ed DUNOD, 5ème édition. Paris, P414.
- Sasson A., 1991. Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. *CIHEAM - Option Mediterranean – Série seminaries n°14*: 59-74.
- Schauenberg P., Paris F., 1977. Guide des plantes médicinales. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris, 396 P.
- Scriban R., 1999. Biotechnologie. Ed. Techniques et documentation. Paris. 1042P.
- Seemanti G., Bisswijit G., Sumita J. 2006. Aluminium chlorideenhances colchicines production in root cultures of *Gloriasuperba*. *BiotechnolLett*, Vol. 28, p.p. : 497-503.
- Singh K.V., Rinki J., Priti T., Dixit V.K., 2010. Elicitation as yield enhancing strategy for glycyrrhizin production by cell cultures of *Abusprecatorius Linn*. *In vitro cell DevBiol Plant*, Vol. 46, p.p. : 354-362.
- Skoog D.A., Holler F.J. et Nieman T.A., 2003. Principes d'analyse instrumentale. 1^{ère} édition, Ed. De Boeck Université, 945 P.

- Souret F.F., Kim Y., Wyslouzil B.E., Wobbe K.K., Weathers P.J., 2003. Scale-up of *Artimisiaannua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpinoid gene expression. *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 83, n. 6, p.p. : 653-669.
- Spollansky C.T., Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M., 2000. Effect of jasmonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, n.1, by Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Srivastava S., Srivastava A.K., 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 27, p.p. : 29 – 43.
- Stougaard Jens, Dorte Abildsten , Kjeld A. Marcker (1987). *Agrobacterium* segment pRi ADB-TL comme système vecteur de gène pour la transformation des plantes
- Tao J., Li L., 2006. Genetic transformation of *Toreniafournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African journal of botany*, vol. 72, p.p.: 211-216.
- Tepfer D., 1982. La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacteriumrhizogenes*. Deuxième colloque sur les recherches fruitières. Bordeaux. Ed. INR- CTIFL : 46-53.
- Thurzova L., 1981. Les plantes-santé qui poussent autour de nous. Bordas. pp: 88-89.
- Tikhomiroff C., 2001. Etude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthusroseus* en vue du développement d'un modèle cinétique. Th. maître es sciences appliquées, Génie chimique, Université de Montréal, Ecole polytechnique, 235 P.
- Tikhomiroff C., 2002. Mécanismes de transformation de plantes dicotylédones par *agrobacteriumtumefaciens*. [http:// tikho. Com/agro/titre.gif](http://tikho.Com/agro/titre.gif).
- Toivonen L., 1993. Utilization of Hairy Root Cultures for Production of Secondary Metabolites. *Topical paper*, n°9, pp: 12-20.
- Tourte Y., 1998. Génie génétique et biotechnologie : concepts et méthodes. Ed. Dunod. 209p.
- TrầnThị M., Mignard B., Vinter E., Ayala O., Phung V., BuiCach T., Dechaux C., Lanoue A., Boitel-Conti M., Bourgaud F., Gontier E., 2004. Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* Mill cultivé en hydroponie; Evaluation d'un procédé générique de production de métabolites végétaux a usage thérapeutique et/ou cosmétique. Séminaire de l'Ecole Doctorale . Nancy, pp : 322-330.
- Tyler RT, Eilert U, Rijnders CO, Roewer IA., Kurz W.G.W., 1988. Semicontinuous production of sanguinarine and dihydrosanguinarine by *Papaversomniferum* L. cell

suspension cultures treated with fungal homogenate. *Plant Cell Reports*, Vol. 7, p.p. : 410-413.

- Tzfira T., Li J., Lacroix B., Citovsky V., 2004. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*, Vol. 20,n. 8, p.p. : 375-383.
- 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. Thèse D.E.A. Université de Picardie Jules Verne. Amiens.
- Valnet J., 1983. Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes. 5^{ème} édition. Maloine S. A. paris. P727.
- Vasconsuelo A., Boland R., 2007. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, vol, 172, p.p.: 861–875.
- Veersham C., 2004. In *Elicitation: Medicinal Plant Biotechnology*, C.B.S. Publisher, India, p.p. : 270-293.
- Verdrager J., 1978. Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Le *Datura*. Ed. Maloine S.A. Paris. pp : 96-97.
- Vincent J.M., 1970. *Manual for the practical study of the root nodule bacteria*. Ed. IBP. 164 P.
- Volak J., Jiri S., 1983. *Plantes médicinales : 256 illustrations en couleurs*. Ed. Grund, Paris. 319 P.
- Vu T., Tran T., Biteau F., Mignard B., Fevre J.P., Guckert A., Bourgaud F. et Gontier E., 2006. Improvement of secondary metabolites production in hydroponic cultures by mechanical and biological processes. *University Ho Chi Minh*, pp: 195-200.
- Wiart C., 2006. *Ethnopharmacology of Medicinal Plants*. Ed. Humana Press, Totowa, New Jersey. p228.
- Wink M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Ed. *Phytochemistry*, vol. 64, p.p.: 3–19.
- Woese C.R., Gupta R., Hahn C.M., Zillig W., Tu J., 1984. The phylogenetic relationships of three sulphur-dependent archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, vol. 5, p.p.: 97-105.
- Wu J.D., Wong K., Ho K.P., Zhou L.G., 2005. Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. *Enzyme Microb Technol*, Vol. 36, p.p. 133-138.

- Zarouri B., 2006. Induction de chevelus racinaires par *Agrobacteriumrhizogenes* sur explants de *Datura stramonium* L. en vue d'améliorer la production d'alcaloïdes. Thèse Ing. INA. Alger. 46P.
- Zhao J., Davis L. C., Verpoorte R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, Vol. 23, p.p. : 283-333.
- Zhao J., Hu Q., Guo Y. Q., 2001. Effects of stress factors, bioregulators, and synthetic precursors on indole alkaloid production in compact callus clusters cultures of *Catharanthusroseus*. *ApplMicrobiolBiotechnol*, Vol. 55, p.p. :693–698.
- Zhao J., Zhu W. H., Hu Q., Guo Y. Q. 2000. Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthusroseus* cell cultures by osmotic shock. *Biotechnology Letters*, V. 22, p.p. : 1227–1231.
- Zhi-Bi H. et Min D., 2006.Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *Journal of integrative plant biology*, Vol.48, n 2,p.p. : 121-127.

Annexes

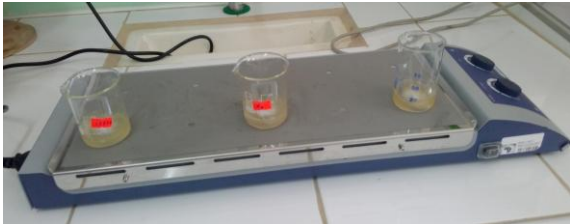
Annexe 1. Matériels utilise durant l'expérimentation



Balance de précision



pH-mètre



Agitateur-plaque chauffante



Etuve



Autoclave



Distillateur

Annexe 2. Composition chimique du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)

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

Annexe 3. Composition chimique du milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968)

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

Annexe 4. Analyse de la variance

Tableau de l'analyse de la variance (ANOVA)

Teneur en hyoscyamine

	Somme des carrés	Ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	139758.817	3	46586.272	3.494E10	.000
Intra-groupes	.000	8	.000		
Total	139758.817	11			

Résultats du test de Tukey

Teneur en hyoscyamine

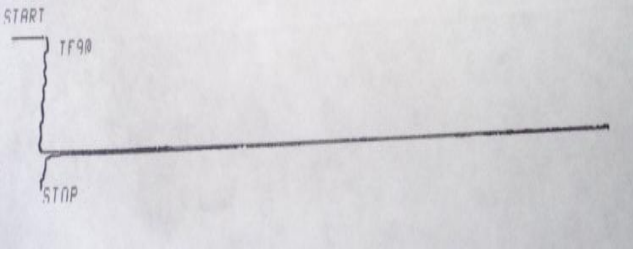
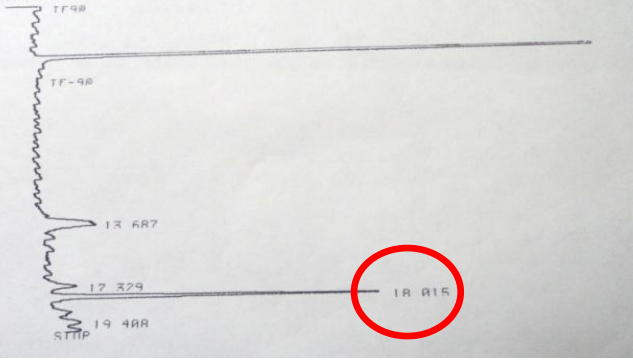
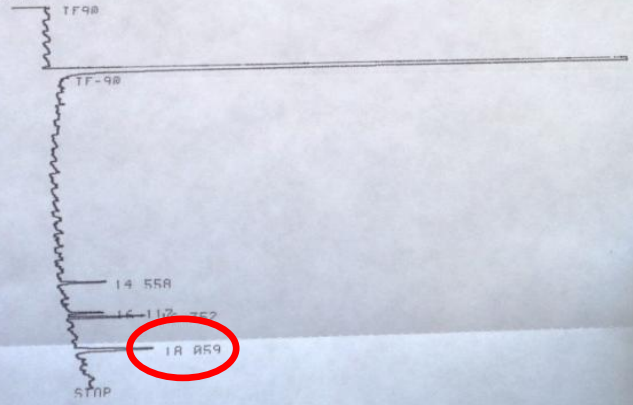
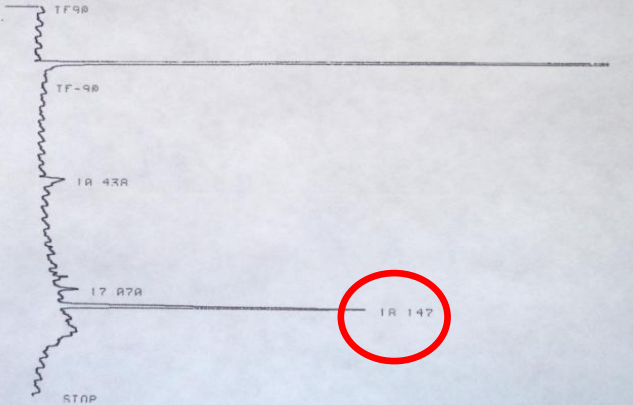
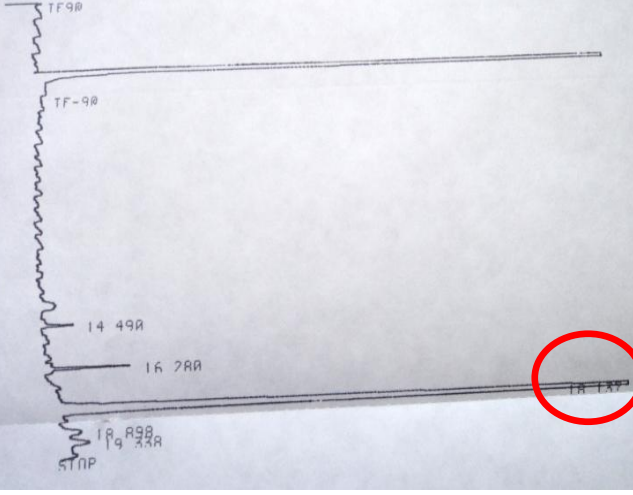
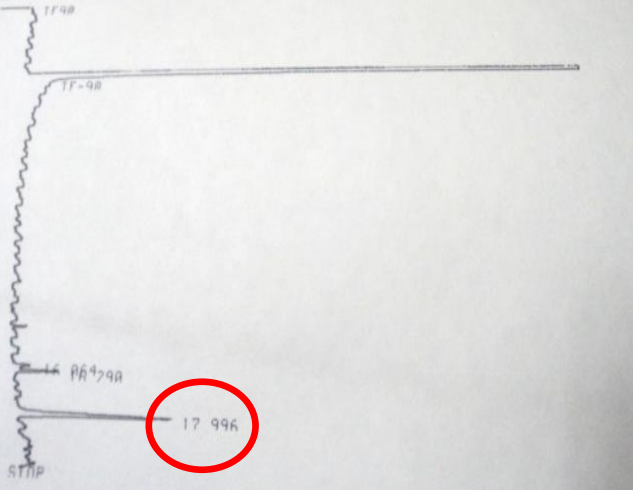
Teneurs en Hyoscyamine

Lignées racinaires	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Test de Tukey ^a					
Racines normales	3	6.6300 ^D			
A4	3		29.7000 ^C		
15834	3			57.3500 ^B	
15834 traitée 2mg/l CaCl2	3				276.9813 ^A
Signification		1.000	1.000	1.000	1.000

Les moyennes des groupes des sous-ensembles homogènes sont affichées.

a. Utilise la taille d'échantillon de la moyenne harmonique = 3.000.

Annexe 5. Chromatogrammes CPG

 <p>START TF90 STOP</p>	 <p>START TF90 TF-90 13 687 17 329 19 488 STOP</p>
Chromatogrammes de solvant utilisé	Chromatogrammes de la gamme étalon
 <p>START TF90 TF-90 14 558 16 112 18 859 STOP</p>	 <p>START TF90 TF-90 18 438 17 878 18 147 STOP</p>
Chromatogrammes de l'hyoscyamine extraite à partir des racinaires non transformé de <i>Datura stramonium</i>	Chromatogrammes de l'hyoscyamine extraite à partir de la lignée N1 de <i>Datura stramonium</i>
 <p>START TF90 TF-90 14 498 16 288 18 147 19 898 STOP</p>	 <p>START TF90 TF-90 16 847 17 996 STOP</p>
Chromatogrammes de l'hyoscyamine extraite à partir de chevelus racinaires N1 élicité par CaCl2 de <i>Datura stramonium</i>	Chromatogrammes de l'hyoscyamine extraite à partir de la lignée M2 de <i>Datura stramonium</i>

Induction de chevelus racinaires chez *Datura stramonium* et extraction des métabolites secondaires.

Résumé : Dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, notre travail a porté sur l'induction des chevelus racinaires d'une espèce de la famille des solanacées, du genre *Datura* (*Datura stramonium* L) par deux souches d'*Agrobacterium rhizogenes* (A4 et 15834) ainsi que l'extraction de l'hyoscyamine à partir des lignées sélectionnées.

Les résultats obtenus montrent que *Datura stramonium* L. présente un taux de germination très élevé ainsi qu'une meilleure réponse vis-à-vis de l'induction des racines transgéniques. En effet la souche 15834 est plus virulente puisque elle a donné le taux d'induction racinaire le plus important (55.88%) par rapport à la souche A4 (30%).

Par ailleurs, les teneurs en hyoscyamine obtenues avec les lignées racinaires transformées sont plus élevées par rapport à celles obtenues avec les racines non transformées. L'étude de l'effet du CaCl₂ utilisé comme éliciteur de la biosynthèse de l'hyoscyamine avec une concentration de 2 g/l et un temps de contact de 24H révèle des résultats très intéressants. Il permet une amélioration de la teneur en hyoscyamine d'environ 182% par rapport au témoin.

Mots clés : *Datura stramonium*, *Agrobacterium rhizogenes*, chevelu racinaire, CPG, hyoscyamine, élicitation.

Induction of *Datura stramonium*'s root hairs and extraction of secondary metabolites.

Abstract: In the context of the valorization of Algerian flora, our work focused on the induction of the root hairs of a species of the Solanaceae family, of the genus *Datura* (*Datura stramonium* L) by two strains of *Agrobacterium rhizogenes* (A4 and 15834) as well as the extraction of hyoscyamine from the selected lines.

The results obtained show that *Datura stramonium* L has a very high germination rate and a better response to the induction of transgenic roots. Indeed the 15834 strain is more virulent since it gave the highest rate of root induction (55.88%) compared to the strain A4 (30%).

In addition, the hyoscyamine contents obtained with the transformed root lines are higher compared to those obtained with the unprocessed roots. The study of the effect of CaCl₂ used as elicitor of the biosynthesis of hyoscyamine with a concentration of 2 g / l and a contact time of 24 hours reveals very interesting results. It allows an improvement in the hyoscyamine content of about 182% compared to the control.

Keywords : *Datura stramonium*, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, CPG, hyoscyamine, elicitation.

تحريض الجذور المشعرة في ل *Datura stramonium* واستخراج المركبات الثانوية.

ملخص: في إطار تقييم النباتات الجزائرية تركز عملنا على جذور مشعرة من عائلة جنس الداتورة *Datura stramonium* بواسطة نوعين من البكتيريا سلالة 4A و 15834 وايضا استخراج الهوسيامين من الجذور المختارة.

D أظهرت النتائج المحصل عليها/ *Datura stramonium* L تحتوي على معدل انتاش عالي وأفضل استجابة لتحريض الجذور المعدلة وراثيا. في الواقع سلالة 15834 أكثر فعالية من سلالة 4 لأنها تعطي أكبر معدل لتحريض الجذور والمتمثل في (55.88%) مقارنة بسلالة 4A (30%).

اضافة الى ذلك اعلى محتويات الهوسيامين تم الحصول عليها في الجذور المشعرة مقارنة بالجذور العادية. دراسة تأثير CaCl₂ بتركيز 2 غ/ل لمدة 24 ساعة المستخدم كمحفز حيوي لزيادة نسبة الهوسيامين. اظهرت لنتائج مثيرة للاهتمام حيث يسمح بتحسين محتوى الهوسيامين حوالي 182% مقارنة بالشاهد.

الكلمات المفتاح: *Datura stramonium*، *Agrobacterium rhizogenes*، جذور مشعرة، هوسيامين، تحفيز.