

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد بوضياف – المسيلة
Université Mohamed Boudiaf - M'Sila

FACULTE SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES
AGRONOMIQUES
N° : 16/DSA/2021



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE
FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES
OPTION : PRODUCTION VEGETALE

Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Master Académique

Par : AMROUNE Ines

YOUSFI Soulaf

SEFIANE Randa

Intitulé

Induction de chevelus racinaires chez *Datura sp*
en vue de production de métabolites secondaires
d'intérêts pharmaceutiques

Soutenu devant le jury composé de :

Mr. HAMDANI Mourad	MAA	Université Med BOUDIAF- M'SILA	Président
Mme. BAKIRI Nouara	MAA	Université Med BOUDIAF - M'SILA	Rapporteur
Mme. LALLOUCHE Bahia	MCA	Université Med BOUDIAF- M'SILA	Examinatrice

Année universitaire : 2020 /2021

Remerciement

*Nous tenons à remercier chaleureusement notre directrice de
recherche: Mme BAKIRI Nouara pour son aide et sa
disponibilité*

Mr. HAMDANI Mourad d'avoir accepté de présider le jury
***Mme. LALLOUCHE Bahia d'avoir bien voulu juger notre
travail***

*Nous présentons notre gratitude à nos parents qui étaient
toujours à nos côtés avec leurs encouragements et leurs
prières*

*Nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin
à l'élaboration de notre travail de fin d'étude.*

Dédicace

C'est avec un grand plaisir que je dédie ce modeste travail

A l'être le plus cher de ma vie, ma mère.

A celui qui m'a fait de moi une femme, mon père.

A mes chers Sœurs et mon frère

A mon cher mari

A tous mes collègues Randa , soulef et mes amis de promotion 2eme master pdv

INES

Dédicace

A ma très chère mère

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne serai point te remercier comme il se doit.
Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence a mes cotés a
toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

A mon très cher père

*Tu as toujours été à mes cotés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail
traduit ma gratitude et mon affection*

A mes très chers frères Ammare et yasser,

mes belles sœurs imane...sara...et ma petite fille...tawba.

Puisse Dieu t'a donné santé, bonheur, courage et rarteut réussite

À tous mes amis et mes chers collègues de travail: ines , soulaf

A mes chers professeurs et touts mes amies 2ème année master 2020 2021.

*A toute personne qui occupe une place dans mon cœur A tous les membres de
ma famille et toute personne qui porte le nom SEFIANE je dédie ce travail à
tous ceux qui ont participé et Tous ceux qui ont contribué de prés ou de loin.*

RANDA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A la personne le plus chère dans le monde, la lumière de ma vie, la source de tendresse, celle qui a sacrifié et souffert les plus belles années de sa vie pour me voir un jour réussir:

"Mon cher père El khier"

A la plus noble des femmes, celle qui, par son courage, a consacré tous ses efforts, et ses moyens pour m' aider á accomplir ce mémoire, et pour me faire réussir

"Ma mère Yousfi. N"

A mes très chères soeurs: Ibtissame - Nessrine - Yassmine .

A mes très chères frères: Walide - Mouhamed.

A mes adorables nièces sans oublier mes chères amies: Kamilia, Khalissa, Rania, Khaoula et á mon trinômes dans ce travail: Ines, Randa.

*A mes chers professeur et toutes mes amies en 2 éme année master promotion
2020/2021*

SOULAF

Résumé

Le *Datura stramonium* est une plante adventice, médicinale et toxique, appartenant à la famille des solanacées , sa toxicité est due aux alcaloïdes tropaniques dont l'atropine, l'hyoscyamine et la scopolamine elle présente une importance pour l'industrie pharmaceutique.

Notre travail a porté sur l'induction des chevelus racinaires par *l'Agrobacterium rhizogenes*, et la transformation génétique pour produire des métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutiques et amélioration de la production d'alcaloïde . Nous sommes entrés en collision avec des conditions personnelles et l'urgence de coronavirus, donc on n'a pas fait notre expérimentation c'est pourquoi nous avons essayé de tirer des conclusions des thèses précédentes

Mots clés : *Datura stramonium, Agrobacterium rhizogenes ,chevelu racinaire , alcaloïdes tropaniques*

Summary

Datura stramonium is a medicinal and toxic weed, among the Solanaceae, its toxicity is due to the tropane alkaloids are atropine, hyoscyamine and scopolamine. which is of importance to the pharmaceutical industry.

Our work focused on the induction of root hairs by *Agrobacterium rhizogenes*, and genetic transformation to produce secondary metabolites of pharmaceutical interest and improvement of alkaloid production. We collided with personal conditions and the emergency of coronavirus, so we did not do our experimentation that is why we tried to draw conclusions from previous theses.

Keywords: *Datura stramonium, Agrobacterium rhizogenes, hairy root, , tropane alkaloids*

ملخص

الداتورة السترامونيوم هي عشب طبي وسام ، من بين الباذنجان ، تسممها بسبب قلويدات التروبان وهي الأتروبين والهيوسيامين والسكوبولامين. وهو أمر مهم لصناعة الأدوية.

ركز عملنا على تحريض شعر الجذر بواسطة *Agrobacterium rhizogenes* ، والتحول الجيني لإنتاج مستقلبات ثانوية ذات أهمية صيدلانية وتحسين إنتاج قلويد. اصطدمنا بالظروف الشخصية وحالة الطوارئ الخاصة بفيروس كورونا ، لذلك لم نقم بتجربتنا لهذا السبب حاولنا استخلاص النتائج من الأطروحات السابقة.

الكلمات المفتاحية الجذور المشعرة , القلويدات التروبانوية *Datura stramonium, Agrobacterium rhizogenes* .

Sommaire

Résumé	
Remerciement	
Introduction	1
PREMIERE PARTIE: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Généralité sur <i>Datura stramonium</i>	4
I.1. Position systématique du genre <i>Datura</i> L.....	4
I.2. Origine et répartition	5
I.3. Caractéristiques de la plante.....	5
I.4. Aspect génétique de <i>Datura stramonium</i>	7
I.5. Intérêt et utilisations de <i>Datura stramonium</i>	7
I.6. Contenus alcaloïdiques.....	8
I.7. Diversité des alcaloïdes chez <i>Datura stramonium</i>	10
II. Métabolites secondaires.....	10
II.1. Intérêt et utilisations (le rôle des métabolites dans la plante)	10
II.2. Métabolites secondaire du <i>Datura</i>	11
II.3. Contenus alcaloïdiques du <i>Datura</i>	11
II.4. Biosynthèse des alcaloïdes tropanique :	15
II.5. Activité biologique des alcaloïdes du <i>Datura stramonium</i>	16
II.6. Extraction et dosage des alcaloïdes.....	18
III. La maladie du chevelu racinaire.....	19
III.1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	19
III.2 Plasmide Ri.....	21
III.3. Mécanismes de la transformation par l' <i>Agrobacterium</i>	23
III.4. Intérêts de la culture des chevelus racinaires.....	24
IV. La production des alcaloïdes à partir de chevelus racinaires	24
IV.1. Optimisation des conditions de croissance et du milieu.....	25
IV.2. Elicitation	25
IV.3. Utilisation de précurseurs	26
IV.4. Immobilisation des cellules	27
IV.5. Perméabilisation des cellules.....	27
V. Paramètres étudiés	28
V.1.Objectif du travail	28

V.2. Germination des graines de <i>Datura stramonium</i>	28
V.3. Obtention des chevelus racinaires	28
V.4. Sélection des lignées racinaires performantes:	29
IV. Détermination de la cinétique de croissance des chevelus racinaires	30

DEUXIEME PARTIE : Résultats et interprétations

I. Germination des graines de <i>Datura</i>	32
II. Obtention des chevelus racinaires	33
II.1 Taux de réactivité.....	33
II.2 Taux d'induction racinaire	33
II.3. Temps moyens d'apparition de la première racine	34
II.4. Nombre moyen de racines par explant.....	34
III. Sélection des lignées racinaires	34
IV. Evolution de la biomasse des chevelus racinaires (cinétique de croissance).....	37
Conclusion.....	41
Référence Bibliographique.....	43

Liste des figures

Fig. 1 : Apareil végétatif du <i>Datura stramonium</i>	6
Fig. 2 : Morphologie de <i>Datura stramonium</i> L. (parcelle de l'INA).....	7
Fig 3. : Structure de la Scopolamine	12
Fig 4: Structure de L'hyoscyamine.	13
Figure 5: structure chimique de l'atropine	14
Fig. 6: la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques du <i>Datura stramonium</i>	16
Fig 7: Structure du plasmids Ri d' <i>Agrobacterium rhizogene</i>	21
Figure 8: Biomasse des lignées retenues cultivées dans le milieu B5 liquide (G.=0.44x) ;....	36
Figure 9: Cinétique de croissance des chevelus racinaires.....	37

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales paramètres pharmacocinétiques des alcaloïdes de <i>Datura stramonium</i> chez l'homme	13
Tableau 2: Pourcentages de l'atropine et de la scopolamine dans les différentes parties de la plante <i>Datura stramonium</i> quantifié par la GC/MS	15
Tableau 3 : Principales opines servant à la classification des plasmides Ri d' <i>A. rhizogenes</i>	22
Tableau 4: Variation des taux d'induction racinaire en fonction des provenances de <i>D. Stramonium</i>	33
Tableau 5 : Variation du temps moyen d'apparition de la première racine (jours) en fonction des provenances de <i>D. stramonium</i>	34
Tableau 6: Effet des souches d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> sur l'induction des chevelus racinaires	34
Tableau 7: Lignées racinaires sélectionnées après 12 jours de culture sur milieu MS de <i>Datura stramonium</i>	35

Liste des abréviations

M.S : Matière sèche ;

MS : Milieu de culture de Murashige et Skoog (1962)

B5 : Milieu de culture de Gamborg et al., (1968)

CPG : Chromatographie Phase Gazeuse

CRs : les chevelus racinaires

g: Gramme

GC/MS: Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.

m : Mètre

M : Mole

M.C: Milieu de culture

mg : Milligramme

MII: métabolites secondaires

ml: millilitre

rpm: Round per minute (rotation par minute)

SNC: System nerveux central

T.H. : Teneur en hyoscyamine

Introduction

Introduction

Introduction

A travers des siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales qui présentent une source intarissable de métabolites secondaires ayant des intérêts multiples mis à profit dans la biotechnologie (**Muanda Nsemi, 2012**) et particulièrement en industrie pharmaceutique (**Sasson, 1999**).

Dans la plante, les métabolites secondaires se trouvent à des concentrations limitées et ne se rencontrent que dans des tissus spécifiques. Toutefois, Il est admis que le métabolisme secondaire est associé aux mécanismes de défense des plantes contre les stress biotiques et environnementaux d'une manière générale (**Raven et al., 2000 ; Hopkins, 2003 ; Wuyts, 2006 ; Calatayud et al., 2013**).

L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des maladies vient habituellement de la croyance qu'elles présentent une très faible toxicité du fait de leur origine naturelle. Selon l'organisation mondiale de la santé, autour de 80 % de la population du monde emploie la médecine traditionnelle pour le soin de santé (**Gomes et al., 2012**). Le *Datura stramonium* L. figure parmi ces plantes possédantes des propriétés médicinales importantes.

Le *Datura stramonium* est considéré comme plante adventice, appartenant à la famille des *Solanaceae*, très utilisé dans les préparations officinales, du fait qu'elle renferme des teneurs importantes d'alcaloïdes tropaniques dont les plus importants sont l'hyoscyamine, la scopolamine et l'atropine. Ils sont issus du métabolisme secondaire, elles présentent un groupe important du fait de leurs propriétés sédatives, mydriatiques, anticholinergiques, analgésiques, antispasmodiques et bactéricides (**Kresanek, 1981**) leur consommation à des doses élevées par l'homme peut causer des troubles mortels (**Fredman et Levin, 1989**)

Actuellement, la majorité des molécules synthétisées par les plantes d'intérêt pharmaceutiques, non seulement *Datura stramonium*, sont extraites directement de la plante entière cultivée en serre ou en plein champ. Ces molécules, appelées métabolites secondaires, ne constituent pas des espèces chimiques impliquées dans la croissance ou la respiration des plantes (**Tikhomiroff, 2001**).

Les métabolites secondaires des végétaux sont d'un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire et dans le cosmétique (**Wink, 1990 ; Sasson, 1991**). Les alcaloïdes occupent une place prépondérante parmi les composés du métabolisme secondaire des plantes (**Wuyts, 2006**). On distingue trois familles d'alcaloïdes. Parmi elles, les alcaloïdes tropaniques dont les plus importants sont la scopolamine, l'atropine et l'hyosyamine.

Introduction

La production d'alcaloïdes par culture en plein champ est généralement très coûteuse et dépend des facteurs climatiques et leur synthèse par voie chimique est complexe et onéreuse. Ces aléas ont orienté les chercheurs à se pencher sur la mise au point de protocoles pour leur production par voie biotechnologique (cals et suspensions cellulaires). Cette voie constitue une alternative de choix à la culture de plein champ (**Shanks et Morgan, 1999; Banerjee et al., 2012**). Il apparait clairement que la culture *in-vitro* offre l'avantage d'un contrôle des conditions environnementales, d'où une régularité de la production (**Toivonen, 1993 ; Srivastava et Srivastava, 2007**). En effet, la culture *in-vitro* offre l'avantage d'un contrôle des conditions environnementales et donc, une régularité de laproduction (**Toivonen, 1993 ; Srivastava et Srivastava, 2007**).

La production des alcaloïdes tropaniques nécessite un tissu spécialisé comme les chevelus racinaires induits par *Agrobacterium rhizogenes*, vu leur croissance rapide, leur stabilité génétique et biosynthétique (**Giri et Narasu, 2000 ; Amdoun et al., 2006**).

Ces chevelus racinaires sont uniques avec un avantage additionnel comme source continue de production de métabolites secondaires (**Hamill et al., 1986 ; Mukundan et al., 1998**). Pour ses besoins pharmaceutiques, l'Algérie importe ces alcaloïdes et ce, malgré la présence en Algérie, à l'état spontané, de nombreuses ressources génétiques de *Datura* qui peuvent être valorisées (**Houmani, 1999**).

PREMIERE PARTIE
Synthèse bibliographique

I. Généralité sur *Datura stramonium*

Le genre *Datura* appartient à la famille des Solanacées (Quezel et Santa, 1963), à alcaloïdes tropaniques, ayant des propriétés thérapeutiques très recherchées en pharmacologie. Le mot *datura* est dérivé du mot *tatorah* chez les arabes, *dhatura* chez les hindoustanis et *tat* ou *tatula* chez les perses qui signifie piquant, transformé par les arabes en *datura* (Mountain., 1987; Richard et Senon, 2001). Le mot *stramonium* est l'ancien nom générique, il est peut-être dérivé du mot *struma* ou *stroma* qui signifie enflure (Mountain., 1987; Gaire., 2005)

D'après Chalandre (2000), Linné nommait les plantes de cette famille, les " blêmes ", les " tristes ", car les feuilles ont plutôt un aspect tombant avec des couleurs assez ternes. Pour les *Daturas*, d'autres appellations existent dont : *stramoine*, *pomme épineuse*, *chasse-taupe*, *herbe du diable*, *endormeuse* et *trompette des anges* (Cecchini, 1976 ; Aloïs Schmid, 1986).

Cette plante est connue sous différents noms communs dans le monde. En France ; la *Stramoine*, ou *Datura* est connu autant qu'herbe aux sorcières ou magiciens. Elle est connue aussi sous le nom de *pomme de diable*, ou *pomme épineuse* à cause du fruit, ou également *endormie* (Bianchini, 1975). Selon Houdé (1985), les italiens lui donnent les noms de *Stramonio*, *Mela Spina* ou *Phono Spinoso*. En arabe, on la connaît surtout par *chedjeret el djinna*, *djhanama*, *messekra*, *Tatoura*, *El khela* et *Datoura* (Trabut, 1935 ; kobt, 1981).

Boulos (1983) rapporte qu'en Algérie, le *Datura stramonium* présente plusieurs noms, suivant les régions du pays. Chez les Berbères il prend les noms de *Tabourzisgt* ou *Tidilla.*, par contre dans le reste du pays c'est plutôt : *Shejret el Janna*, *Tatura*, *Nefir*, *Datura*, *Semm el Far*, *Djahanana*, ou *Messekra*. Il est plus connu sous le nom *Habala*. Le fruit prend le nom de *Djouza matel* et les graines de *Habet el Fouha*.

I.1. Position systématique du genre *Datura L*

Règne : Plantae.

Sous règne : Tracheobionta.

Embranchement : Spermatophyta.

Sous embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida.

Sous classe : Asteridae.

Ordre : Solanales.

Famille : Solanaceae.

Sous famille : Solanoideae.

Genre : *Datura*. (Gaire, 2008).

I.2. Origine et répartition

Datura stramonium a été décrit pour la première fois en 1753 par Linné (**Benhizia, 1989**) ; elle préfère les sols argileux, légèrement basiques, humide et les expositions bien ensoleillées (**Houmani, 1999**). Selon **Cecchini (1976)**, elle est originaire du Caucase alors que **Volka et al. (1983)** cite l'Amérique du nord comme origine du *D. stramonium*. **Schauenburg et Paris (1987) in Benhizia (1989)**, rapportent que cette espèce est originaire d'Amérique centrale, et est localisée dans les régions chaudes de l'Europe, d'Asie et d'Afrique. C'est une espèce cosmopolite que l'on rencontre dans de nombreuses régions du globe (**Mairura et Setshog, 2008**).

D'après (**Quezel et Santa, 1962**) En Algérie, on trouve le *Datura stramonium* du littoral jusqu'au Sahara central, cette plante spontanée abonde les champs, les décombres, les terrains vagues, les endroits incultes et les bords des chemins (**Schauer et Caspari, 2007**).

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

I.3. Caractéristiques de la plante

I.3.1. Appareil végétatif

Le *Datura stramonium* L est une plante annuelle herbacée, de 0,3 à 1 m de hauteur (**Cecchini, 1976 ; Fluck, 1977 ; Schauenberg et Paris, 1977 ; Bezanger et al., 1980 ; Garland, 1980**). Cette espèce est toxique à odeur nauséabonde, la saveur est désagréable et amère. La racine est forte, rameuse, fibreuse et blanchâtre (**Cazin et Cazin, 1997**), la tige, pouvant atteindre plus d'un mètre de hauteur, est droite, creuse, simple ou ramifiée, glabre, verte devenant parfois violette (**Cazin et Cazin, 1997**), quant aux feuilles, elles sont longuement pétiolées, ovales, s'amincissant à la base en pétiole, pointue à l'apex, dentées ou presque foliolées, dessus vert foncé, dessous vert clair, atteignant 20 cm de long (**Plan, 1988**).



Fig. 1 : Apareil végétatif du *Datura stramonium* (Csapody, 1961).

I.3.2. Appareil reproducteur

Les fleurs sont solitaires ou par deux, en entonnoir, grandes et blanches (Gaillardet *al.*, 2001), de 6 à 10 cm de diamètre (Schauenberg et Paris, 1977 ; Arouko *et al.*, 2003), présentent une corolle tubuleuse en forme de vase, l'ensemble rappelant une trompette (d'où le nom de « trompette des anges »(Arouko *et al.*, 2003), Calice tubulaire atteignant 4.5 cm de long, légèrement renflé, 5 arêtes, 5 dents courtes. Corolle de 5.5 à 7.5 cm de long (Plan, 1988). Selon Volak et Jiri (1983), le fruit est une grosse capsule épineuse à déhiscence multiple, tétraloculaire par formation tardive d'une fausse cloison, de couleur verte et renferme une grande quantité de graines noires, réniformes, à surface réticulée. Les graines sont réniformes, aplaties sur une face, de 4-5 cm de long sur 2-3 mm de large et 1 à 1,5 mm d'épaisseur.

Le tégument est noirâtre, plus clair au niveau du hile. La surface de la graine est chagrinée, réticulée, ponctuée. La section longitudinale montre sous le tégument, un albumen huileux, blanc, entourant l'embryon deux fois recourbé. Elles ne dégagent pas d'odeur particulière si elles ne sont pas broyées. La saveur est tout d'abord huileuse, puis âcre et nauséuse (Paris et Moyse, 1971).

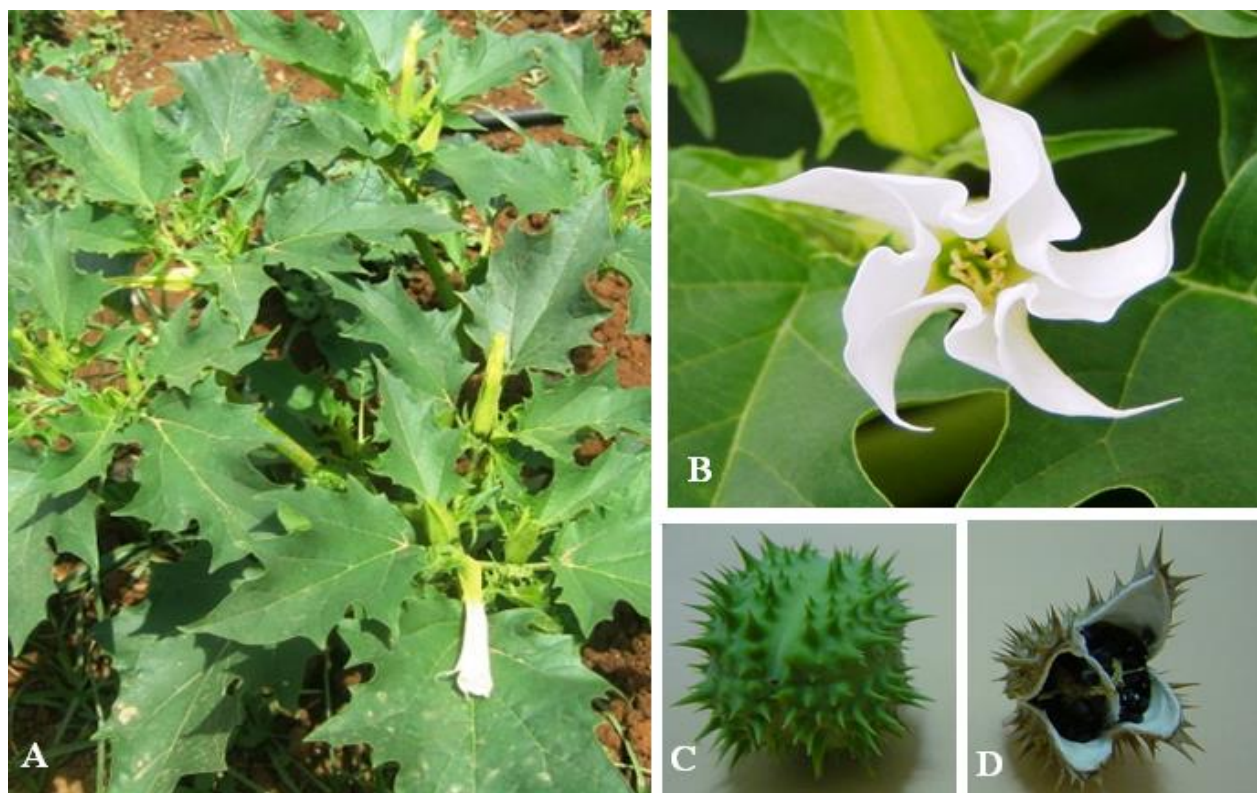


Fig. 2 : Morphologie de *Datura stramonium* L. (parcelle de l'INA)

A : Plant de *Datura stramonium* B : Fleur C, D : Fruits (G X 1/1.6) (Bakiri, 2007) .

I.4. Aspect génétique de *Datura stramonium*

Baiza et al. (1999) signalent que le *Datura stramonium* possède douze paires de chromosomes, soit à l'état diploïde ($2n=2x=24$) ou tétraploïde ($2n=4x=48$).

D'autres auteurs ont mis en relation la structure cytogénétique et la composition alcaloïdique. Ainsi, selon Berkov et Philipov (2002), le contenu alcaloïdique des racines et des feuilles des *Datura* tétraploïdes est plus élevé que le contenu des *Datura* diploïdes.

I.5. Intérêt et utilisations de *Datura stramonium*

Les *Datura* sont connus pour leurs propriétés médicinales intéressantes depuis fort longtemps.

I.5.1. Usages traditionnelles et médicinales

Le *Datura stramonium* a été largement utilisé dans le chamanisme ou la sorcellerie. Les Indiens algonquins utilisaient ses racines pour préparer une boisson à boire aux jeunes afin qu'ils perdent leurs souvenirs d'enfance (Arouko., 2003). Cette plante est souvent utilisée comme médicament anti-asthmatique ; en fumigant des cigarettes ou des feuilles hachées mélangées à du tabac (Spichiger et al., 2002 ; Pretorius et Marx, 2006), utilisée, aussi, pour soigner la folie (La Rousse., 2001). Au Nigeria, les feuilles et les graines écrasées sont

mélangées à de l'huile de palme pour traiter les piqûres d'insectes sévères (**Egharevba et Ikhatua, 2008**).

Les parties aériennes de la plante sont utilisées pour traiter l'hypertension artérielle et les maladies cardiaques (**Eddouks et al., 2002**), l'extrait aqueux des graines est utilisé dans le traitement des douleurs gastrique et l'indigestion, (**Gidado et al., 2007**). Les fleurs sont anesthésiantes dans les cas de carie dentaire (**Bremness., 2005**). Propriétés anti-inflammatoires de toutes les parties de la plante, propriétés anti-oxydantes, anti-rhumatismales et hypoglycémiantes. Il est également utilisé pour les brûlures, les ulcères, les infections des sinus, les maux de tête et les plaies (**Devi et al., 2011**), pour stimuler le système nerveux central (SNC), soulager la congestion respiratoire, traiter les maux de dents et la chute des cheveux (**Gidado et al., 2007**).

Les feuilles de *Datura stramonium L.* sont utilisés pour le soulagement des maux de tête ainsi que ces vapeurs d'infusion sont adoptées pour revivre la douleur de rhumatismes et la goutte. La fumée de la feuille de combustion est inhalée pour le soulagement de l'asthme et la bronchite. (**Paolo, 2001**). Le même auteur rapporte que le *Datura stramonium L.* a été utilisé en médecine interne pour traiter la folie, l'épilepsie et la dépression. Extérieurement, il constitue la base de pommade pour les brûlures et les rhumatismes. L'extrait d'acide formique de la partie aérienne de *Datura* a une activité antibactérienne (**Eftekhar et al., 2005**).

I.5.2. Usages agricoles

La plante peut être utilisée comme agent antifongique, nématicide (**Marc., 2000**) et antiparasitaire pour les moutons et les poulets (**Viegi et al., 2003**). Selon **Sanjita et al. (2012)**, La culture de cette plante agit comme un insectifuge et protège la plante des insectes voisins. Les graines de stramoine sont utilisées pour engraisser certains animaux (**Bonnier, 1990**). En agriculture, ils peuvent être utilisés pour la lutte biologique contre les acariens des cultures et les aleurodes (**Beliard et al., 2002, Rolard 2002**). Selon **Rollard (2002)**, les mandalas ont de nombreuses applications dans le domaine de l'assainissement des eaux et des sols ; par exemple, ils sont utilisés pour absorber les déchets radioactifs : (Cas du Laboratoire Los Alamos en Californie, épuration d'eau contenant des métaux radioactifs ou toxiques). **Wang et al. (2012)** rapportent que le *D. stramonium L.* a été identifié comme une espèce de matière première prometteuse pour le biodiesel.

I.6. Contenus alcaloïdiques

Les alcaloïdes peuvent être définis comme des composants de base qui contiennent un atome d'azote dans leur structure moléculaire complexe et peuvent présenter des activités

pharmacologiques importantes (**Roberts et Wink, 1998**). D'après **Hopkins (2003)** ils forment une grande famille très hétérogène de métabolites secondaires y compris le groupe des alcaloïdes tropicaux. Ce sont des esters de tropanol et d'acides à structure variable, aliphatiques ou aromatiques (**Bruneton, 1999**). D'après **Pelikan (1986)** ; **Ami et Arnett (1995)**, le *Datura stramonium* renferme plusieurs alcaloïdes tropaniques notamment l'atropine, l'hyoscyamine, et la scopolamine. On les classe sous trois groupes:

- Les alcaloïdes vrais : l'azote est contenu dans les hétérocycles, ce groupe représente la plupart des alcaloïdes. (**Guignard, 2000**).
- Les proto-alcaloïdes: Ils n'ont pas d'azote cyclique et leur structure est similaire à celle des amines (**Guignard, 2000**).
- Les pseudo-alcaloïdes: Ils ont généralement toutes les caractéristiques des vrais alcaloïdes, mais ne sont pas des dérivés d'acides aminés (**Bruneton, 1999**).

Arouko et al. (2003) ont rapporté que pendant la période de pleine floraison, la teneur en alcaloïdes dans différentes parties de la même plante change comme suit :

- Feuilles : 0,3 à 0,4 %,
- Racines : 0,3 %,
- Graines : 0,3 à 0,6 %,
- Calice de la fleur : 0,3 %,
- Corolle de la fleur : 0,02 %,

Les alcaloïdes tropaniques provoquent chez l'homme divers réponses physiologiques parce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A forte dose, la plus part des alcaloïdes sont très toxiques. Par contre à faible dose, ils peuvent avoir d'importantes applications pharmaceutiques (**Hopkins, 2003**).

L'hyoscyamine et la scopolamine présentent des propriétés parasymphathologique et antispasmodique (**Bruneton, 1999**). Ils provoquent la diminution des sécrétions et la décontraction des muscles lisses, des muscles du tube digestif, ceux des parois des bronches et ceux de la vessie (**Iserin, 1999**). Ce sont des sédatifs, ils dilatent la pupille (mydriatiques), et accélèrent le rythme cardiaque. A forte dose, ils provoquent des délires entrecoupés de vision et d'hallucinations, et même la mort (**Garland, 1980 ; Pelt, 1980**). Selon **Valnet (1983)**, les alcaloïdes de *Datura* sont indiqués pour la maladie de Parkinson, névralgie, asthme, transpiration et anxiété. Ils semblent aussi efficaces contre les douleurs de l'entorse, du rein, de la vésicule biliaire et du colon (**Verdrager, 1978**)

I.7. Diversité des alcaloïdes chez *Datura stramonium*

Les alcaloïdes possèdent une grande diversité dans leur origine botanique et biochimique, leur structure chimique et leur action pharmacologique. La classification phytochimique des alcaloïdes est basée sur l'origine de l'acide aminé utilisé pour fabriquer cet alcaloïde. (Evans WC, WB Saunders, 1996.)

En 2002, 29 alcaloïdes ont été identifiés par GC-MS, chez *Datura stramonium* L. à partir de racines, feuilles et graines. 21 nouveaux alcaloïdes tropaniques ont été décrits pour la première fois pour cette espèce et deux esters tropanols identifiés pour la première fois. Il s'agit du 3-3-acetoxytropoyloxy tropane et 3-2-hydroxytropoyloxy tropane (Berkov et Philopov, 2002).

II. Métabolites secondaires

II.1. Intérêt et utilisations (le rôle des métabolites dans la plante)

Le métabolisme chez les végétaux est un processus très dynamique caractérisé par une synthèse et une dégradation des molécules pour assurer un équilibre cellulaire parfait. Cependant, l'essentiel produit lors de ce métabolisme est orienté vers la synthèse de molécules vitales et impératives pour la structuration et le fonctionnement des cellules, ce sont les métabolites primaires tels que les protéines, les glucides, les lipides ainsi que les acides nucléiques (Hopkins, 2003), alors que d'autres voies de biosynthèse, dérivant du métabolisme primaire, non essentiel à la survie de la plante sont connues sous le nom de métabolites secondaires (Hartmann, 2007). Selon Gobbi et Khebbaz, (2014) les métabolites végétaux secondaires peuvent être définis comme des molécules indirectement nécessaires à la vie végétale, plutôt que des métabolites primaires (protéines, lipides et glucides). Ces métabolites secondaires sont impliqués dans la structure des plantes (lignine et tanins), et ils ont une influence décisive sur l'adaptation des plantes à l'environnement.

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules impliquées dans l'adaptation des plantes à leur environnement et la régulation de la symbiose et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les agents pathogènes (Judd *et al.*, 2002). Ils jouent différents rôles : Signaux de communication entre les plantes et les micro-organismes symbiotiques, signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à un changement de l'environnement, moyens de défense contre les herbivores, pathogènes (phytoalexines) et les virus, empêchent les rayons ultraviolets ou tout autre stress corporel (wink.2010). D'autres MII protègent la plante des rayons ultraviolets ou tout autre stress

corporel. Il existe trois grandes familles de MII chez les plantes : les alcaloïdes, les terpénoïdes et les (poly) phénols. Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux alcaloïdes.

II.2. Métabolites secondaire du *Datura*

Les métabolites secondaires produits par les *Daturas* sont d'un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire (**Sasson, 1991**). La plante est riche en une variété de métabolites secondaire tels que les tanins, les terpénoïdes, alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, stéroïdes, glycosides et huiles volatiles (**Banso et Adeyemo, 2006**).

Les alcaloïdes sont considérés comme des composés organiques d'origine naturelles, azotés, plus au moins basique, de distribution restreinte et doués, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées. Le regroupement d'un tel ensemble est confirmé par des réactions de précipitation (**Cordell et al.,2001**).Les alcaloïdes tropaniques, sont la classe d'alcaloïdes la plus abondante chez les *Daturas*, dont la scopolamine et l'hyoscyamine, utilisés en pharmacologie humaine et vétérinaire (**Shimomura et al., 1991**).

II.3. Contenus alcaloïdiques du *Datura*

Parmi tous les métabolites secondaires, les alcaloïdes sont les seules molécules d'origine naturelle ayant des bienfaits assez considérables, notamment, pour leurs utilisations cliniques. Ils peuvent être considérés comme les plus utiles et au même temps, les plus dangereux produits de la nature (**Aniszewski, 2007**). D'après **Ami et Arnett (1995)**, le *Datura stramonium* renferme plusieurs alcaloïdes tropaniques notamment l'atropine, l'hyoscyamine, et la scopolamine. Selon **Arouko et al, (2003)**, les alcaloïdes totaux sont présents dans le *Datura stramonium* à une teneur de 0.2 à 0.6%, dont les deux principaux sont l'hyoscyamine et la scopolamine. Répartis pour un tiers en scopolamine et deux tiers en atropine et l-hyoscyamine.

Les travaux de **Benhizia (1989) ; Houmani (1999)** montrent que le taux d'alcaloïdes varie fortement selon les stades ontogéniques et d'un organe à un autre : la phase juvénile, la teneur en alcaloïdes est dominante dans les racines, la phase de maturité, est caractérisée par une forte augmentation des alcaloïdes dans la plante au niveau des feuilles et des fleurs, la phase de sénescence, correspondant au début de maturation du fruit, les alcaloïdes s'accumulent en forte concentration dans les graines. Les plantes jeunes sont riches en scopolamine par rapport aux plantes âgées riches en hyoscyamine.

A. Scopolamine

La scopolamine (également connu sous le nom de hyoscine= scopine tropate) est l'ester du scopolan et l'acide tropique, de formule brute $C_{17}H_{21}O_4$ (Fig. 3)(Fabre et Truhaut., 1961; El Bazaoui., 2009). Sa masse molaire est de 303.36 (Steenkamp et al., 2004, Pujol et al., 2006). C'est une poudre blanche, basique, dont les sels sont hydrosolubles (Dangoumau et al., 2006), elle est soluble dans la plupart des solvants organiques (Chopra et al., 1960), tel que l'éthanol, l'éther et le chloroforme (Drager., 2002), son point de fusion est de $59^{\circ}C$ (Drager., 2002; Alexander et al., 2008). La scopolamine administrée par voie orale est rapidement absorbée. Elle est presque entièrement métabolisée par le foie, seule une proportion se retrouve inchangée (<5%) (Alexander et al., 2008). La demi-vie de la scopolamine est d'environ huit heures; la scopolamine et ses métabolites sont excrétés par le rein (Desachy et al., 1996).

Elle est souvent utilisée en association avec la morphine et la spartéine pour la préparation à l'anesthésie générale des grandes interventions chirurgicales (Verdrager, 1978). De même, la scopolamine, est utilisée pour calmer les douleurs rénales, les douleurs de la vésicule biliaire et du colon (Paul et al., 2007). On l'utilise également en injection intramusculaire ou intraveineuse pour soulager l'entorse. A forte dose, la scopolamine entraîne des hallucinations et dans le cas extrême des états comateux (Dorvault, 1982). Elle est utilisée dans la prévention du mal des transports par un système adhésif à appliquer sur la peau derrière l'oreille. Ce système contient 1.5 mg de scopolamine qui est libérée progressivement à travers la membrane du système (Bruneton, 1999).

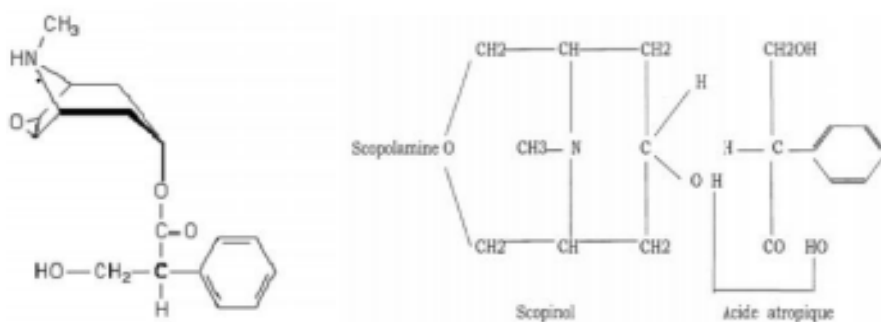


Fig 3 : Structure de la Scopolamine. (Alexander et al., 2008)

B. Hyoscyamine

L'hyoscyamine (= isomère racémique de l'atropine) est un mydriatique énergique, ses effets physiologiques sont plus intenses (Dorvault, 1982). D'autres actions de l'hyoscyamine sont soulignées par le même auteur, tel que : l'effet paralysant sur les fibres musculaires

lisses, cette paralysie permet une action antispasmodique notamment sur le tube digestif, les voies respiratoires et la vésicule biliaire.

Selon **Grzegorz et al. (2008)**. La hyoscyamine et l'atropine ont la même formule chimique et la même activité pharmacologique, mais la première est plus active que la deuxième, et c'est cette dernière qui est utilisée en médecine, car elle est stable et moins sensible aux enzymes hydrolytiques

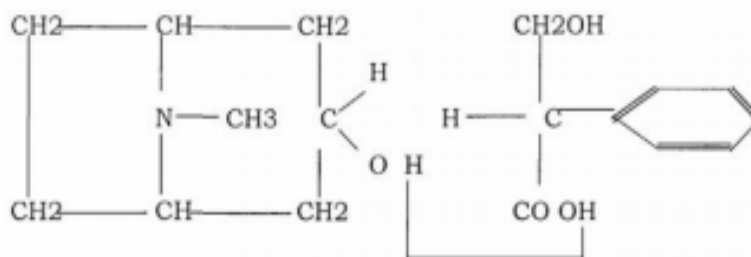


Fig 4: Structure de L'hyoscyamine. (**Lailheugue, 1983**).

Tableau 1: Principaux paramètres pharmacocinétiques des alcaloïdes de *Datura stramonium* chez l'homme (**Goullé et al., 2000**)

	Atropine (DL-hyoscyamine)	Scopolamine (L-hyoscyne)	Hyoscyamine
Demi-vie (heure)	2-5	3-8	3-8
Volume de distribution (1/kg)	1-6	1.4	1.4
Concentrations thérapeutiques (mg/ml)	2-25	0.1-1.0	0.1-1.0
Concentrations toxiques (mg/ml)	20-30	-	-
Concentrations létales (mg/ml)	>200	-	-

C. L'atropine

L'atropine est une poudre blanche (**Dangoumau et al., 2006**), de formule moléculaire C₁₇H₂₃NO₃ (**Goullé et al., 2004; Alexander et al., 2008; El Bazaoui., 2009**), son poids moléculaire est de 289.37 (**Steenkamp et al., 2004; Alexander et al., 2008**), ayant un point de fusion: 115.5 ° c (**Fabre et Truhaut., 1961; Alexander et al., 2008**), elle cristallise en aiguilles anhydres, incolores et soyeuses. Sa saveur est amère et désagréable. En solution aqueuse et surtout à chaud, elle est hydrolysée en acide tropique et tropanol (**Fabre et Truhaut., 1961**), elle est peu soluble dans l'eau (**Grevoz et Laubriet, 2007**), soluble dans l'éther et l'acétate d'éthyle et très soluble dans le chloroforme et l'alcool (**Fabre et Truhaut., 1961**).

Selon Paris et Hurabielle (1981), l'atropine agit au niveau du cœur par une accélération cardiovasculaire (Kenneth et al., 2001) et elle entraîne une bronchodilatation (bronchectasie). Mais l'effet le plus marqué de l'atropine est celui qu'elle exerce sur la pupille en la dilatant avec photophobie (Alexander et al., 2008 ; Javier et al., 2008). De plus, elle est utilisée pour les traitements de l'ulcère d'estomac et comme antispasmodique dans le traitement des troubles intestinaux (Kenneth et al., 2001 ; Mateus et al., 1999). L'atropine peut également être utilisée dans le traitement du syndrome parkinsonien (Stenkamp et al., 2004).

L'atropine est absorbée très rapidement par les muqueuses, sa diffusion se fait dans tout l'organisme, y compris le système nerveux central (SNC), le placenta et des traces d'atropines sont trouvées dans différentes sécrétions, dont le lait maternel. (Pretorius et Max, 2006). Il n'y a pas d'hydrolyse sérique chez l'homme. L'atropine est métabolisée partiellement dans le foie. L'élimination se fait principalement par voie rénale. Une quantité allant jusqu'à 60% est excrétée sous forme inchangée dans les urines et le reste sous forme d'une fraction métabolisée. (Alexander et al., 2008).

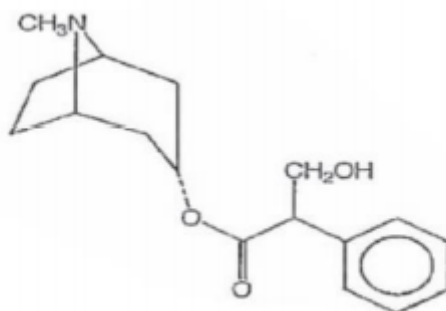


Figure 5: structure chimique de l'atropine (Pujol et al., 2006).

Tableau 2: Pourcentages de l'atropine et de la scopolamine dans les différentes parties de la plante *Datura stramonium* quantifié par la GC/MS (**Iranbakhsh et al., 2006**).

Alcaloïdes	Atropine		Scopolamine		Totale	
	Phase végétative	Phase générative	Phase végétative	Phase générative	Phase végétative	Phase générative
Etape de développement						
Organes						
Feuille	0.037	0.030	0.090	0.020	0.127	0.050
Pétiole	0.080	0.062	0.042	0.020	0.122	0.082
Capsule	0.064		0.034		0.098	
Tige	0.070	0.070	0.023	0.023	0.093	0.093
Racine	0.045	0.056	0.000	0.013	0.045	0.069
Graine	0.000		0.020		0.020	

II.4. Biosynthèse des alcaloïdes tropanique

La biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est aujourd'hui l'une des biosynthèses les plus connues des métabolites secondaires. Les principales voies de biosynthèse de la scopolamine et de l'hyoscyamine sont bien connues (**Vu Thi, 2008 ; Robin et al., 1991**). Les racines sont le principal lieu de synthèse des alcaloïdes tropaniques (**Miraldi et al., 2001 ; Kang et al., 2004; Jordan et al., 2006 ; Hartmann., 2007**), et leurs modifications secondaires se produisent dans la partie aérienne, le transport via le xylème (**Flores et al., 1999; Berkov et al., 2005**).

L'alcaloïde tropanique tire son noyau tropane de l'ornithine et de l'arginine. Cette dernière est décarboxylée en putrescine par deux enzymes, tour à tour l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine décarboxylase (ADC) (**Deng, 2005**). L'étape suivante consiste à transformer la putrescine de méthyle en N-méthylputrescine par la putrescine N-méthyltransférase (PMT) (**Drager, 2002; Cordell, 2012**). Par la suite, la N-méthylputrescine est désaminée par la diamine oxydase (DAO) en 4-amino-butanol, qui se cyclise spontanément pour former le cation N-méthyl-D1-pyrroline (**Gryniewicz et Gadzikowska., 2008**). Le cation N-méthyl-D1-pyrroline est condensé avec de l'acide acétoacétique pour obtenir de l'hygrine, qui est cyclisée pour obtenir la tropinone, et le tropinol est obtenu sous l'action de la tropinone réductase I (TRI) (**Deng, 2005**).

L'atropine est produite par la racémisation de l'hyoscyamine (**Reichl et al., 2004 ; Palazón et al., 2008**). Cette dernière produit la 6 B-hydroxyhyoscyamine sous l'action de l'hyoscyamine 6 B-hydroxylase (H6H) (**Vakili et al., 2012**)

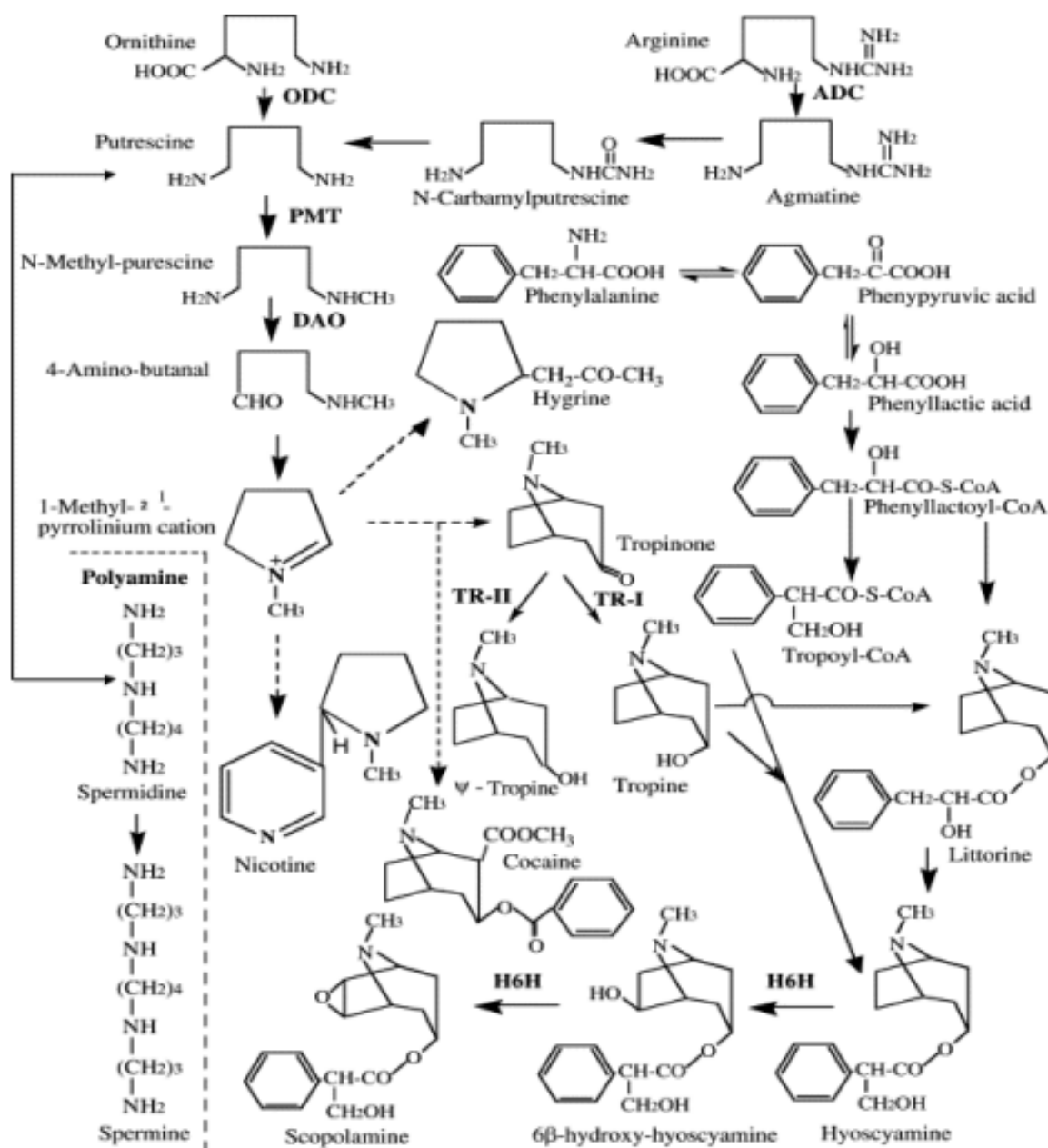


Fig. 6: la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques du *Datura stramonium* (Deng., 2005)

ADC: Arginine Décarboxylase,

PMT: Putrescine N-Méthyle Transférase

DAO: Di Amine Oxydase,

TR : Tropine Réductase ODC: Ornithine Décarboxylase

II.5. Activité biologique des alcaloïdes du *Datura stramonium*

L'activité biologique des alcaloïdes a été bien connue depuis le début de la civilisation humaine. ils ont été utilisés en phytothérapie traditionnelle pour soigner les maladies, et il continuent à susciter l'intérêt de l'homme pour tirer profit de leurs bienfaits sur la santé (Aniszewski, 2007). De nombreux alcaloïdes se distinguent par une action physiologique

caractéristique sur l'homme et sur les animaux, en particulier au niveau du système nerveux ou ils interfèrent avec les neurotransmetteurs (**Richter, 1993 ; Bruneton, 1995**).

A. Atropine

L'atropine est une substance classée comme un antagoniste compétitif non sélectif des récepteurs muscariniques (**Halpern et Sewell, 2005; Pretorius et Marx, 2006; Diether et al., 2007**). Cette substance a des effets parasympholytiques (**Attenhofer et Pellikka, 2003; Barguil., 2011**). Elle inhibe de façon compétitive et réversible la fixation de l'acétyl choline aux récepteurs muscariniques (**Flesch, 2005**), localisés dans les organes périphériques innervés par les fibres post- ganglionnaires parasymphatiques, ainsi que dans le système nerveux central (**Bruneton., 1999; Salen et al., 2003**), d'où ses effets sympathomimétiques (**Flesch, 2005**). Seules les formes lévogyres (L-hyoscyamine, fraction L de la DL-atropine) ont une activité sur les récepteurs muscariniques (**Goullé et al., 2004**).

B. Scopolamine

La scopolamine a une action sédatrice, hypnotique dans l'agitation psychomotrice, elle majeure en intensité et en durée les effets déprimeurs des autres alcaloïdes sur le système nerveux central (**Montcriol et al., 2007**). C'est un antagoniste muscarinique (**Wei-Wei Zhang et al., 2008; Nurhan et al., 2005; Patricia et al., 2004**) structurellement similaire à l'acétylcholine, elle abaisse les concentrations d'acétylcholine cérébrale, l'inhibition des récepteurs qu'elle provoque, est responsable d'une libération exagérée d'acétylcholine, rapidement détruite par les cholinestérases (**Henri et al., 2003**). Les organes qui dépendent de système parasymphatique présentent cependant une sensibilité variable aux effets bloquant de la scopolamine.

C. Intoxication du *Datura*

La toxicité des *Datura* aussi bien pour l'homme que pour le bétail a été connue depuis fort longtemps, et jusqu'à présent la fréquence des intoxications par les *Datura*, toutes espèces et formes confondues n'est pas négligeable. Ces intoxications sont en effet dues à la teneur alcaloïdiques élevée de ces plantes (**Vitale et al., 1995 ; Bruneton, 2005, Nelson et al., 2007**). Selon **Chan (2002)**, le tableau clinique des personnes intoxiquées par cette plante, est dominé par les troubles du comportement avec hallucinations visuelles, auditives, tactiles, désorientation spatio- temporelle, agitation motrice, rougeur de la face, une mydriase, délire, tachycardies et hyperthermie. Dans les cas les plus graves, il est possible d'observer des convulsions, une détresse respiratoire et le coma (**Lapostolle et Flesch, 2006 ; Montcriol et al. 2007**).

En Algérie, les intoxications par les *Datura* ont lieu généralement en période estivale et au début de l'automne. Leur caractère cosmopolite et leurs propriétés anticholinergiques font de ces plantes des végétaux toxiques pour les adolescents qui recherchent des sensations et pour les toxicomanes (**Bouzi** *et al.*, 2002)

II.6. Extraction et dosage des alcaloïdes

A. Extraction

L'extraction des alcaloïdes des plantes est basée sur la différence de leur solubilité en milieu acide et alcalin (**Broneton**, 1995). Utiliser des solvants organiques non polaires, des solvants organiques polaires ou de l'eau acidifiée pour l'extraction (**Paris et Hurabielle**, 1981).

La purification implique le transfert des alcaloïdes de la phase organique à la phase aqueuse par acidification, et inversement, le transfert des alcaloïdes de la phase aqueuse à la phase organique par alcalinisation : éliminant ainsi les solvants organiques solubles (lipides, résines, chlorophylle) et les impuretés de l'eau. Les impuretés solubles telles que les sucres, les sels minéraux et les sels organiques (**Paris et Hurabielle**, 1981), pour sa caractérisation, les techniques de chromatographie sur couche mince et d'électrophorèse les plus utilisées (**Paris et Hurabielle**, 1981).

B. Dosage

Selon **Javillier et al.**, (1959), de nombreuses méthodes de dosage des alcaloïdes ont été proposées, principalement :

- ✓ Méthode gravimétrique, dans laquelle les alcaloïdes sont précipités sous forme de sels (silicotungstate),
- ✓ Méthode du volumétrique (méthode alcaline ou utilisation du réactif Valser-Mayer pour précipiter les alcaloïdes
- ✓ Méthode Colorimétrique basée sur la réaction colorée spécifique des alcaloïdes,
- ✓ Méthodes physiologiques... etc Dans un volume donné de médicament, une distinction doit être faite entre la dose d'alcaloïdes totaux et la dose d'alcaloïdes spécifiques.

La méthode gravimétrique est facile à mettre en œuvre, mais la simple pesée des résidus AT manque de précision : l'excès d'erreur ne peut être ignoré, et cette méthode est propice à être remplacée par d'autres méthodes. Dans le cas de la méthode volumétrique, il peut être opéré par la méthode de l'acidité directe ou la méthode de retour d'acidité la plus courante : dissolution du résidu dans un excès d'acide titré et dosage en retour de l'excès de

l'acide par une base de titre connu en présence d'un indicateur coloré. Le cas échéant, on peut recourir à la protométrie en milieu non aqueux (bases faibles) (Bruneton, 1999).

Les méthodes spectrophotométriques sont très sensibles et assez fréquemment préconisées : dosage des alcaloïdes de type quinine et de type cinchonine par mesure de l'absorbance à deux longueurs d'onde dans les écorces de quinquina, dosage de la caféine dans la feuille de thé,...etc. Si le dosage ne peut être effectué directement, il est possible de séparer le composé à doser par CCM et de procéder à la mesure de l'absorbance après élution des taches. Les méthodes colorimétriques peuvent également être appliquées au dosage d'un alcaloïde (ou d'un groupe) (Bruneton, 1999).

III. La maladie du chevelu racinaire

Depuis 1980, les chevelus racinaires ont été utilisés comme un système expérimental pour l'étude du métabolisme racinaire et aussi comme une alternative à la culture de suspensions cellulaires pour la production de principes chimiques (Lanoue et al., 2004). Flores et Medina-bolivar (1995) rapportèrent que durant les années 1985-1995, l'approche de production de métabolites secondaires par les chevelus racinaires a été utilisée par de nombreux laboratoires dans le monde entier pour une large multitude d'espèces et de métabolites secondaires. Dernièrement, des développements récents indiquent que la technologie de culture des chevelus racinaires pour la production de principes pharmaceutiques, a passé de la petite échelle du laboratoire vers la production industrielle de grande échelle selon (Guillon et al., 2006).

Les chevelus racinaires sont obtenus par transformation génétique des cellules végétales par *Agrobacterium rhizogenes*. Cette bactérie infecte une large gamme de plantes dicotylédones causant la prolifération de racines adventives c'est le syndrome du « Hairy root » ou chevelu racinaire (Veena et Taylor, 2007).

III.1 *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium est une bactérie du sol, gram négatif appartenant à la famille des Rhizobiaceae. Le genre *Agrobacterium* regroupe à la fois des saprophytes et des parasites. Les deux espèces les mieux connues sont les bactéries pathogènes de plantes : *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes*. De nombreuses dicotylédones et certaines espèces de monocotylédones peuvent être infectées par ces deux espèces d'*Agrobacterium* (De Cleene et De Ley, 1976; Porter, 1991). Il existe plusieurs espèces d'*Agrobacterium* dont les deux plus connus sont *A.*

tumefaciens et *A. rhizogenes* (Tourte, 1998). Cette dernière est une bactérie du sol qui provoque chez certaines plantes la formation d'un chevelu abondant de racines (Tepfer, 1982).

Ces eubactéries ne sporulent pas et se présentent sous forme de bacilles de 0,6 à 1 um de largeur et de 1,5 à 3 um de longueur. Elles sont mobiles grâce à la présence de 1 à 6 flagelles péritriches (Kerstens et De Ley, 1984; Tourte, 2001; Prescott et al., 2003; Murugesan et al., 2010). Elles vivent en aérobie stricte à une température optimale de croissance de 25°C à 28°C (Chriqui, 1998; Wlodarczyk, 2010), mais la plupart des souches sont capables de pousser sous une pression d'oxygène réduite (ce qui est le cas dans les tissus végétaux par exemple) (Portier, 2004).

Les bactéries du genre *Agrobacterium* occupent différents habitats ; elles peuvent vivre librement dans le sol, dans l'environnement racinaire (rhizosphère) ou comme pathogène des plantes (Wlodarczyk, 2010). En milieu solide, elles forment des colonies convexes, circulaires, lisses et de couleur beige claire (Chriqui, 1998).

Les agro-bactéries utilisent une grande variété d'hydrates de carbone, d'acides organiques et d'acides aminés. Quelques espèces utilisent l'ammoniaque ou les nitrates comme source d'azote, alors que d'autres requièrent des acides aminés et d'autres facteurs de croissance (Perry et al., 2004). Ces bactéries ont la faculté de transférer des molécules de leur ADN dans les chromosomes de certaines cellules des plantes (Scriban, 1999).

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

Les racines induites par *A. rhizogenes* ont la propriété unique de pouvoir croître *in vitro* sans régulateurs exogènes de croissance (Lee et al. 2001; Rao et Ravishankar 2002). Grâce à cette capacité unique, grâce à l'utilisation de souches d'*A. Rhizogenes* dans des cultures d'organes végétaux *in vitro*, les difficultés à grande échelle ont été éliminées et, par conséquent, les organes à croissance rapide, capables de produire une ramification étendue et des métabolites encore plus élevés que la plante mère, de nouvelles métabolites non détectés

dans la plante mère, ou encore dans d'autres types de cultures *in vitro* (Doran 2002; Nader et al. 2006; Bensaddek et al. 2008).

III.2 Plasmide Ri

La cause principale de la maladie du chevelu racinaire est la présence d'un grand nombre de plasmides dans les souches d'*Agrobacterium rhizogenes* dénommés les plasmides Ri « Root inducing » (Schell et al., 1976; Currier et Nester, 1976; White et Nester, 1980). Ces plasmides sont groupés dans deux principales classes, selon les opines synthétisées par les chevelus racinaires, les souches de type agropine (exemple : PRIA4, pRi1855, PRIHRI, PRI15834 et PRILBA9402) qui induisent les racines pour synthétiser l'agropine et les acides relatifs ; et les souches de type mannopine (exemple : pRi8196, TR7 et TR101) qui induisent les racines pour produire le mannopine et les acides correspondants (Rhodes et al., 1990). D'autres souches sont aussi identifiées telles que les souches de type cucumopine (représentées par PRI2659) et les souches de type mikimopine (représentées par pRi1724) (Veena et Taylo, 2007).

Le plasmide Ri qui se caractérise par sa grande taille de l'ordre de 200 à 800 kilo bases (kb) (Costantino et al., 1994; Broothaerts et al., 2005) porte un ou plusieurs fragments d'ADN nommés T-DNA (Transferred-DNA), qui sont transférés vers la cellule végétale, et des gènes de virulence (*vir*) qui codent pour des facteurs de transfert nécessaires pour le T-DNA (Hooykaas, 1984 ; Sheng et Citovsky, 1996 ; Zhou et Christie, 1999). Le T-DNA est délimitée par 24 pb de séquences d'ADN répétées qui sont très similaires entre les plasmides Ti et Ri (Slightom et al., 1986).

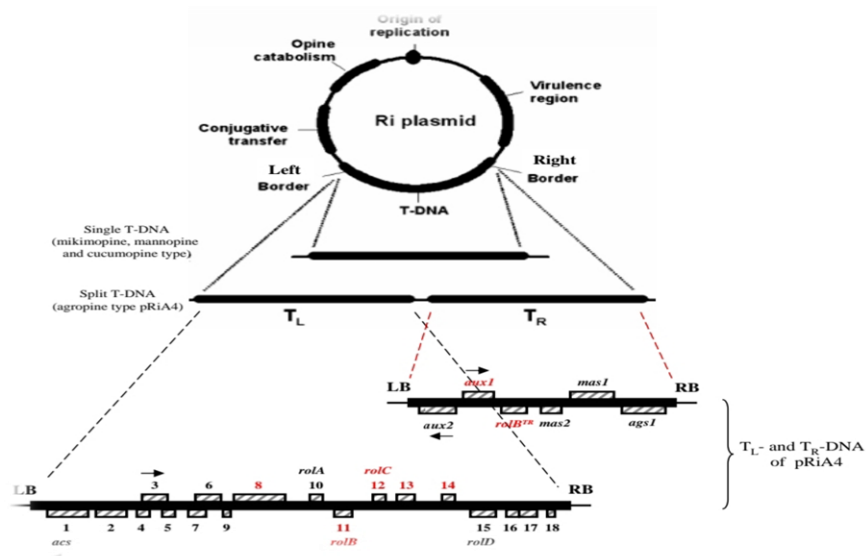


Fig 7: Structure du plasmids Ri d'*Agrobacterium rhizogene* (Mohajjel Shoja, 2010)

Première partie : Synthèse bibliographique

Les souches d'*A. rhizogenes* les plus étudiées sont celles à agropine, considérées comme les plus virulentes. Elles sont les plus souvent employées dans l'établissement des cultures de chevelus racinaires. Deux régions d'ADN-T ont été identifiées dans les plasmides Ri de type agropine, T_L (*T-DNA left*) et T_R (*T-DNA right*). Le type mannopine et cucumopine ne contiennent qu'un seul fragment d'ADN-T, homologue au T_L des plasmides de type agropine. Les deux régions d'ADN-T dans le type à agropine sont séparées d'environ 15 Kb l'une de l'autre de la partie non transférable de l'ADN. Le T_R abrite des gènes homologues à l'ADN-T des plasmides Ti (**Riseuleo et al., 1982 ; Willmitzer et al., 1982 ; Huffman et al., 1984 ; Jouanin, 1984**). Les plus importants parmi ces derniers sont les gènes homologues au *tms1* et au *tms2* des plasmides Ti, impliqués dans la biosynthèse des auxines chez *A. tumefaciens* (**Sinkar et al., 1987**).

Le Ri-TL-DNA porte 4 loci : rolA, rolB, rolC et rolD ou ORFS (Open Reading Frames) (**White et al., 1985, Slightom et al., 1986**), distinguant le plasmide Ri du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* (**Chavarri et al., 2010**). Selon le modèle actuel, l'expression de rolB produit une protéine membranaire (B-glucosidase) qui est spécifiquement utilisée pour surveiller les auxines végétales afin de modifier la réponse des plantes. Cela rend le tissu racinaire plus épais que la normale. Comme rolA, rolC est impliqué dans le métabolisme de l'acide gibbérellique. Un modèle récent suggère que rolC sera impliqué dans le métabolisme et le transport du sucre (**Nilson et al., 1997**). La capacité des gènes rolA, rolB et rolC à induire des racines néoplastiques (croissance plus vite que la normale) dans les tissus est équivalente à celle du TL-DNA entier du plasmide Ri (**Spano et al., 1988**).

Tableau 3 : Principales opines servant à la classification des plasmides Ri d'*A. rhizogenes* (**Chriqui, 1998**).

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

III.3. Mécanismes de la transformation par l'*Agrobacterium*

L'utilisation des agrobactéries pour la transformation génétique des plantes est basée sur leur mécanisme naturel de transformation. Ce mécanisme se fait 3 étapes :

a. Adhésion bactérie-plante

Le transfert de l'ADN-T dans la cellule végétale est une étape essentielle dans le mécanisme d'infection et nécessite d'abord une reconnaissance de la cellule par la bactérie qui s'attache à la paroi de celle-ci (Scriban, 1999), grâce à des gènes portés par le chromosome bactérien (Casse-Delbart, 1999 ; Scriban, 1999 ; Casse et Brietler, 2001).

b. Activation des gènes *vir*.

L'activation du processus d'infection est régulé par les gènes *virA* et *virG* contenus dans le Ti DNA et certain gènes chromosomaux: *chvE* et *acvF*, les gènes *vir* sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure:

1. Les composés phénoliques de type syringone, le plus actif est l'acétosyringone (Davet, 1996 ; Liang et al., 1998 ; Scriban, 1999 ; Giri et Narasu, 2000),
2. Les monosaccharides tels que le glucose et l'acide glucorinique (Tikhomirow, 2002). Il a été montré que l'inositol augmente l'activité de l'hydroxyacétosyringone et, le glucose, le rhamnose et le xylose stimulent l'effet de l'acétosyringone (Yan-Nong et al., 1990 in Flores et Medina-Bolivar, 1995).
3. Le pH acide (Tikhomirow, 2002).

c. Insertion de l'ADN-T dans le génome de la cellule végétale infectée

L'ADN transféré ou ADN-T est une partie particulièrement bien définie d'un plasmide circulaire, plasmide Ti (tumor inducing) pour *A. tumefaciens* et Ri (root inducing) pour *A. Rhizogenes*. Il s'agit d'un fragment de quelque milliers de paires de bases, délimitées à chaque extrémité par des bordures constituées de la même séquence de 25 paires de bases. Ces fragments contiennent en particulier : des gènes de synthèse d'opines (molécules aminocarbonées utilisées par les agrobactéries comme substrat nutritif), des gènes de biosynthèse des substances de croissance (auxine, cytokinine) et des gènes de sensibilité à ces substances et de modulation de la croissance (Davet, 1996 ; Scriban, 1999).

C'est sous forme de simples brins que l'ADN-T est exporté dans le noyau de la cellule végétale cible (Scriban, 1999 ; Casse et Breitler, 2001). Les protéines VirD1 et VirD2 sont des endonucléases spécifiques qui peuvent reconnaître les bords de l'ADN-T (séquence spécifique de 25 pb) et les brins à exporter et à exciser. VirD2 est lié de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ADN-T. Le brin d'ADN-T est recouvert de plusieurs copies (environ 600) de

la protéine VirE2, qui les protège des nucléases de la cellule végétale cible. VirD2, VirE2 et l'ADN-T forment le "complexe T" (Davet, 1996 ; Scriban, 1999 ; Casse et breitler, 2001). L'intégration de l'ADN-T au sein du génome nucléaire se fait au hasard dans les parties qui sont régulièrement transcrites (Tikhomiroff, 2002).

III.4. Intérêts de la culture des chevelus racinaires

Les chevelus racinaires induits par transformation génétique sont généralement très productifs et donnent des rendements élevés en métabolites secondaires notamment en alcaloïdes tropaniques (Giri et Narasu, 2000; Oksman-Caldentey, 2007). Ils sont très denses et dotés d'une croissance rapide pouvant atteindre les 2,5 cm/jour (Souret et al., 2003; Amdoun et al., 2006). Leur croissance est plagiotrope et ils ont la capacité de croître sans addition d'hormones au milieu de culture (Giri et Narasu, 2000; Ono et Tian, 2011). Les racines transgéniques forment une source alternative de production de molécules phytochimiques grâce à leur stabilité génétique et leur capacité biosynthétique en comparaison avec les racines de plantes, les cultures cellulaires et les cultures de cals contenant des cellules indifférenciées (Ono et Tian, 2011).

L'ampleur de la production de ces métabolites secondaires dans les chevelus varie en fonction des espèces (Sevon, Oksman-Caldentey, 2002) et des conditions du milieu. De nombreux métabolites secondaires intéressantes sont synthétisés au niveau des racines (Flores et al., 1999). L'extension de la culture de chevelus racinaires a permis le passage de la production au laboratoire de principes actifs à petite échelle vers la production industrielle à grande échelle (Guillon et al., 2006).

IV. La production des alcaloïdes à partir de chevelus racinaires

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

IV.1. Optimisation des conditions de croissance et du milieu

La biosynthèse de métabolites secondaires est fortement déterminée par les conditions de culture, que ce soit au niveau des plantes cultivées en pleins champs ou les cultures cellulaires et tissulaires in vitro (**Ramachandra Rao et Ravishankar, 2002**). C'est pourquoi l'optimisation du milieu de culture est un facteur critique pour garantir une bonne production de métabolites secondaires par les chevelus racinaires (**Dicosmo et Misawa, 1995; Verporte et al., 2002**).

Les facteurs tels que la source de carbone et sa concentration, la concentration ionique du milieu, le pH du milieu, les phytohormones, l'inoculum sont connus pour avoir des effets significatifs sur la production des alcaloïdes troponiques (**Sevon et Oksman- Caldentey, 2002**). La création élémentaire du milieu de culture influe sur la création en alcaloïdes troponiques, en effet, des particules de Cu^{2+} (**Hilton et Wilson, 1995**), de nitrate, de calcium et de phosphore améliorent la création en alcaloïdes troponiques (**Amdoun et al., 2009**). Cependant l'effet bénéfique de ces éléments ne fait pas l'unanimité chez les chercheurs. En effet, certains auteurs rapportent que le nitrate et le phosphore diminuent le taux des alcaloïdes troponiques et en particulier l'hyoscyamine, selon **Payane et al., (1987)**.

IV.2. Elicitation

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

En général, les éliciteurs peuvent être classés sur la base de leur nature en éliciteurs abiotiques ou biotiques, ou sur la base, de leur origine en éliciteurs exogènes ou endogènes (**Namdeo, 2007**).

A. 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) et les micro-organismes (chitine ou glucane) et les glycoprotéines. 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 **Wang et Wu (2013)**, les principaux éliciteurs biotiques sont :

- ✓ Des cellules bactériennes ;
- ✓ Des éliciteurs d'origine fongique ;
- ✓ Des polysaccharides microbiens ou d'origine végétale ;
- ✓ Des éliciteurs de nature lipidique ou protéique.

B. 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 Ca (**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 ;
- ✓ Des fongicides ;
- ✓ Des herbicides.

D'après **Namdeo (2007)**, les éliciteurs exogènes sont des substances apportées au milieu de culture comme les polysaccharides (Glucomannose, Glucanes, Chitosane), les peptides (Monilicolin, Poly-L-lysine, Polyamines). etc, tandis que les éliciteurs endogènes sont des substances qui se forment à l'intérieur de la cellule suite à une pression biotique ou abiotique comme le dodeca-1,4- D galacturonide ou les hepta-B- glucosides.

C. Rôle de l'élicitation

Selon **Zhao et al., (2005)**, le rôle majeur des métabolites secondaires est de protéger les plantes contre les attaques des herbivores, des insectes et des agents pathogènes ou d'assurer la survie contre les stress abiotiques, l'élicitation de plantes ou de leurs tissus cultivés *in vitro* est une stratégie basée sur ce principe qui a été développée pour améliorer le rendement et la productivité des secondaires dans les cultures cellulaires/ tissulaires *in vitro*. L'élicitation est l'induction ou l'augmentation de la biosynthèse des métabolites par l'addition de traces d'éliciteurs (**Radman et al., 2003**).

IV.3. Utilisation de précurseurs

L'utilisation des précurseurs a été une approche évidente et populaire pour l'augmentation de la production des métabolites secondaires dans les cultures cellulaires, le concept est basé sur l'idée que tout composé qui est intermédiaire biosynthétique de métabolite secondaire, stimule une bonne augmentation du rendement du produit final (**Smetanska, 2008**).

En fait, **Karppinen et al. (2007)** ont rapporté qu'en introduisant des précurseurs biosynthétiques, la production de métabolites secondaires en culture *in vitro* a été augmentée

avec succès. Par exemple, l'alimentation en géraniol augmenter la teneur en composé anticancéreux "paclitaxel" dans la culture en suspension de "taxus" chinensis.

De plus Selon **Liu et al. (2007)** ont étudié les effets de certains précurseurs sur les polyéthylènes glycol (PEG), accumulés dans les cultures de cellules en suspension de *cistanche sala*. La tyrosine, la phénylalanine, acide caféique et jus de concombre ont été utilisés comme précurseurs, sous l'alimentation combinée de précurseurs à des concentration appropriées, production totale de PEG atteint le plus haut niveau.

IV.4. Immobilisation des cellules

L'immobilisation est définie comme une technique qui limite une enzyme ou une cellule catalytiquement active et empêche son entrée dans la phase mobile, qui porte le substrat et le produit, les cellules immobilisées peuvent être employées pour une simple ou multiple biotransformation des précurseurs aux produits désirés comme pour la biosynthèse de nouveaux métabolites secondaires (**Smetanska, 2008**).

Selon **Dörneburg et Knorr (1995)**, le choix approprié du système d'immobilisation est déterminé par différents facteurs notamment, la haut potentiel de rétention de la matrice et la haut de densité cellulaire. De plus, **Dörnenburg (2004)**, a rapporté que l'immobilisation des cellules végétales est très importante car elle peut apporter des bénéfiques potentiels.

D'après **Jardin et al., (1991)**, généralement, les cellules immobilisées prolongent le taux de survie des cellules en maintenant la biomasse plus long temps, en séparant la phase de croissance et la phase de production en facilitant la séparation des biocatalyseurs et des milieux de culture, et en augmentant la densité cellulaire et l'élimination de la phase de croissance pour augmenter la productivité. Cependant, l'isolement vaculaire des métabolites secondaires reste la principale limitation de l'utilisation de techniques d'immobilisation à grande échelle sinon il peut fournir un système de culture plus efficace

IV.5. Perméabilisation des cellules

Selon **Avery et al., (1987)** cité par **Boitel-Conti et al., (1995)**, les cultures de poils absorbants de solanacées ont été les plus étudiées car elle peuvent synthétiser des quantités relativement stables d'alcaloïdes tropicaux .

D'après **Singh et al., (1988)**, les composés recherchés sont généralement difficiles à libérer dans le milieu, et leur accumulation dans les racines est limitée par la rétro-inhibition des enzymes (**Pras et al., 1991 ; Boitel-Conti et al., 1995**). Avec l'activité biosynthétique prolongée des racines transformées, la libération d'alcaloïdes peut être une solution (**Boitel-Conti et al., 1995**).

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

V. Paramètres étudiés

V.1.Objectif du travail

Les solanacées, particulièrement les espèces du genre *Datura* sont connues pour leur contenu alcaloïdique (**Houmani, 1999**). Les alcaloïdes qui forment une grande famille de métabolites secondaires présentent un intérêt incontestable de par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine (**Richter, 1993 ; Houmani, 1999**), ainsi l'objectif de notre travail est de faire une synthèse des travaux déjà réalisés étudiant:

- ✓ Obtention des vitro-semis
- ✓ Induction de chevelu racinaire chez *Datura stramonium* par *d'Agrobacterium rhizogenes*.
- ✓ Sélection des lignées racinaires performantes après l'isolement des racines et multiplication des chevelus racinaires sélectionnés
- ✓ Production des alcaloïdes

V.2.Germination des graines de *Datura stramonium*

Les graines sont ensemencées dans des tubes contenant environ 20 ml de milieu MS (**Murashige et Skoog, 1962**) (Tableau 4), additionné de 7 g/l d'agar et 20 g/l de saccharose. Les cultures sont placées dans la chambre de culture à une température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Le taux de germination de chaque espèce est calculé après 60 jours de culture.

V.3. Obtention des chevelus racinaires

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

Les vitroplants de *Datura* ont été utilisés pour la production des chevelus racinaires. La méthode adoptée pour l'induction de chevelus racinaires est essentiellement celle décrite par **Amdoun et al., (2009)**. Les explants d'hypocotyle (1 cm de longueur) sont inoculés par une suspension bactérienne dans le milieu YEM de la souche A4 *d'Agrobacterium rhizogenes*.

À l'aide d'une seringue stérile, une goutte de la suspension est déposée sur la section basale de chaque explant. Les explants ainsi infectés sont mis en culture sur milieu MS solide contenant 250 mg/l de céfotaxime. La co-culture plante-bactérie est conduite à l'obscurité à 26 ± 1°C. Après 20 à 30 jours de co-culture les racines transgéniques commencent à apparaître sur le site d'infection. Lorsqu'elles atteignent une longueur de 2 à 3 cm, elles sont excisées et transférées sur le milieu MS frais contenant 250 mg/l de céfotaxime afin d'éliminer la bactérie.

Amdoun et al., (2005) rapportent que chaque racine isolée peut être considérée comme lignée unique. **Dhakulkar et al., (2005)** signalent que chaque racine induite par l'*Agrobacterium* est issue d'un événement de transformation indépendant. Ayant atteint une taille et un degré de ramification jugés suffisants, les racines sont découpées en portions de 2 cm non ramifiées. Elles sont par la suite cultivées chacune sur milieu MS solide sans antibiotique. Les racines qui présentent une forte croissance (élongation, ramification) seront retenues, alors que les racines qui présentent une faible croissance, ou qui sont callogènes, seront systématiquement éliminées (**Zarouri, 2006**).

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

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

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

V.4. Sélection des lignées racinaires performantes

Les lignées racinaires obtenues sont sélectionnées, principalement, en fonction de leur biomasse et leur production en hyoscyamine. Les racines qui présentent une faible croissance ou qui sont callogènes sont systématiquement éliminées.

La sélection des lignées racinaires performantes est réalisée dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant environ 50 ml de milieu de culture B5 liquide additionné de 20 g/l de saccharose. Les conditions de culture sont Obscurité totale, température de 26 ± 1°C, pH ajusté à 5,6 - 5,8 et une vitesse d'agitation de 100 rpm. L'inoculum primaire (matériel végétal) est constitué des extrémités de 3 racines non ramifiées d'environ 3 cm (environ 0,1 g de poids frais). Pour chaque lignée trois Erlenmeyers sont utilisés (trois répétitions). Les chevelus

racinaires qui présentent une bonne croissance sont retenus, ils sont choisis selon les 5 critères suivants:

- Vitesse moyenne de croissance (cm/jour)
- Longueur moyenne totale (cm) après 20 jours de culture
- Degré de ramification (estimation visuelle)
- Poids sec des chevelus racinaires exprimé en gramme
- Teneurs moyennes en HS (mg/g M.S.) (**Harfi, 2013**).

IV. Détermination de la cinétique de croissance des chevelus racinaires

De l'ensemble des lignées racinaires obtenues, les lignées non callogènes caractérisées par une bonne croissance seront retenues pour l'étude de la cinétique de croissance des CRs . La biomasse est exprimée en gramme de matière sèche (M.S.) obtenue dans 50 ml de milieu de culture. Les mesures sont réalisées dès le 10^{ème} jour de culture à raison d'une mesure, répétée trois fois, tous les deux jours, et ce, jusqu'au 26^{ème} jour de culture.

Tous les essais sont réalisés dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture B5 liquide additionné de 20 g/l de saccharose, pH ajusté à 5,6 - 5,8. Les cultures sont placées dans les conditions de température de 26±1 °C, dans l'obscurité totale et sous agitation à 100 rpm, l'inoculum primaire est d'environ 0,1 g de CRs frais (**Harfi, 2013**).

DEUXIEME PARTIE
Résultats et interprétations

Dans notre cas, comme nous n'avons pas touché à la partie pratique en raison de toutes les circonstances environnantes, nous avons dû travailler sur les résultats des chercheurs avant

I. Germination des graines de *Datura*

Le taux de germination de cette espèce est calculé après 60 jours (deux mois) de culture chez la plupart des travaux. **Zarouri (2006)** travaillant sur l'induction de chevelus racinaires de *Datura mandala* a enregistré une augmentation de la production d'alcaloïdes et du taux de germination (après deux mois) au cours du développement des vitrosemis, il a enregistré un taux de 90 %, exempts de contamination. **Harfi (2009)** travaillant, aussi sur l'induction de chevelus racinaires de *Datura* par *Agrobacterium rhizogenes* a enregistré une valeur de 75,90 %. **Belabasi et Benouaret (2009)** enregistrent des valeurs différentes de 96% à 98% dans leurs travaux sur l'optimisation de la production d'alcaloïdes extrait des chevelus racinaires de *Datura* en 2011, presque le même résultat (96%) est obtenu par **Hadjimi2011** avec aucune contamination (Production d'alcaloïdes *in vitro* à partir de tissu de *Datura stramonium L.* et effet sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*).

Selon l'étude de **Bakiri (2007)** sur la prospection de la diversité génétique chez quelques provenances algériennes de *Datura stramonium*, et **Morsli (2013)** sur la caractérisation de la diversité génétique de quelques espèces de *Datura L.* en Algérie, les graines scarifiées sont les premières à germer, par rapport aux graines non scarifiées, la température du milieu joue aussi un rôle sur les taux de germinations, ainsi :

- A 20°C les graines non scarifiées mettent 21 jours pour germer, avec un taux de germination maximum de 3 % au 22^{ème} jour, ce temps n'est que de 8 jours pour les graines scarifiées avec un taux de germination optimal de 65 % au 26^{ème} jour de culture.
- A 27°C les graines non scarifiées prennent 3 jours pour germer, avec un taux de germination de 83% au 15^{ème} jour de mise en culture, ce temps n'est que d'une journée pour les graines scarifiées avec un taux de 93% au 12^{ème} jour de culture.
- A 30°C les graines non scarifiées mettent 9 jours pour germer, le taux de germination maximum (20%) au 23^{ème} jour, ce temps n'est que d'une journée pour les graines scarifiées avec 87% de germination au 13^{ème} jour de culture. Les résultats montrent que la température optimale pour la germination des graines de *Datura Stramonium* est de 27°C induisant 93 % de germination.

II. Obtention des chevelus racinaires

II.1 Taux de réactivité

Les travaux de **Harfi (2009)**, **Belabbassi et Benouaret (2009)** ont montré que tous les explants forment un cal au niveau du site d'infection ; Après 6 à 10 jours de l'inoculation par la souche A4 d'*A. rhizogenes* ; le taux de réactivité est de 100 % pour toutes les espèces. De nombreuses études ont montré que la variation dans l'efficacité d'induction de chevelus racinaires dépend fortement des souches d'*A. rhizogenes* utilisées pour l'infection. **Park et Facchini (2000)** rapportent que pour la transformation de l'*Opium poppy*, trois souches d'*A. rhizogenes* : 13333, RI000 et R1200 rolD donnent un taux de réactivité supérieur à 90%, alors que 2 autres souches 15834 et C58CL infectent 80 à 85% des explants et induisent la formation de cals, les taux de réactivité enregistrés par **Amdoun2003** sont de l'ordre de 99% et 77% respectivement pour les souches A 4 et K 47.

II.2 Taux d'induction racinaire

Les résultats obtenus par **Belabbassi et Benouaret (2009)** ont montré que le taux de l'induction varie d'une provenance à l'autre (**tableau 5**), allant de 37.5 chez la provenance de Saida à 62.5% chez la provenance de Ain-Taya, en revanche, les travaux de **Harfi (2009)** ont montré que le taux d'induction racinaire de *Datura stramonium* a atteint 52,5%.

Le taux d'induction de chevelus racinaires varie également en fonction des souches bactériennes (**Kovalenko et Maliuta, 2003**) et de l'espèce végétale utilisées (**De Cleen et De ley, 1981 in Dhakulkar et al., 2005**). En utilisant la souche A pour la transformation génétique d'*Artemisia annua*, le taux d'induction de chevelus racinaires obtenu est de 75% (**Giri et al., 2001. Tao et Li ,2006**) ont obtenu un taux de 55% avec *Torenia fornieri* utilisant la même souche. Dans le cas d'**Amdoun2003** des taux d'induction de 44% et 7% ont été obtenus respectivement avec les souches A 4 et K 47.

Tableau 4: Variation des taux d'induction racinaire en fonction des provenances de *D.*

Stramonium(**Belabbassi et Benouaret, 2009**)

Provenance	Taux d'induction (%)
El-Tarf	59,37B
Ain-Taya	62,5B
Saida	37,5A
Mascara	53,12B

II.3. Temps moyens d'apparition de la première racine

Le temps moyen d'apparition de la première racine enregistré par **Harfi (2009)** est de 26,3 jours pour *Datura stramonium*. **Belabbassi et benouaret (2009)**, ont enregistré un temps moyen variant d'une provenance à une autre, les résultats sont montrés dans le **tableau 05** :

Tableau 5 : Variation du temps moyen d'apparition de la première racine (jours) en fonction des provenances de *D. stramonium* (**Belabbassi et Benouaret, 2009**)

Provenance	Temps moyen d'apparition de la première racine (jours)
El-Tarf	23,47
Ain-Taya	28,4
Saida	23,16
Mascara	14,94

Kovalenko et Maliuta (2003), indiquent que le temps d'apparition des racines transformées au niveau du site d'infection par *A. rhizogenes* varie de 30 à 60 jours pour *Glyeyrrhiza sp.* **Amdoun (2010)** a montré que le temps moyen d'induction des chevelus racinaires dépend de la souche d'*A. rhizogenes* utilisée, en effet, des moyennes de 28 et 53 jours sont enregistrées, respectivement, pour les souches A 4, et K 47 (**Tableau 6**).

Tableau 6: Effet des souches d'*Agrobacterium rhizogenes* sur l'induction des chevelus racinaires (**Amdoun ,2010**).

Souches	Taux de réactivité (%)	Taux d'induction racinaire(%)	Temps d'apparition de la première racine (jours)	Nombre de racines/explant
A 4	99.0	44.0	28.8±8.0	1.7±0.7
K 47	77.0	7.0	53.0±7.0	0.3±0.2

II.4. Nombre moyen de racines par explant

Le nombre moyen de racines par explant varie de 0,62 à 2,06 chez **Belabbassi et Benouaret (2009)**, **Harfi (2009)** dans ses travaux sur l'induction des chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura sp* : rapporte que le nombre moyen de racines par explant enregistré est de 1,1 racines/explant pour *Datura stramonium*, 1,5 racines/explant pour *D. tatula*, 0,4 racines/explant pour *D. innoxia* et de 1,4 racines/explant pour *D. ferox*.

III. Sélection des lignées racinaires

Après culture sur milieu MS semis solide pendant 12 jours, les racines transformées ont montré une croissance globale bonne. Cependant, certains d'entre eux se caractérisent par

Deuxième Partie: Résultats et interprétations

une faible croissance et/ou formation de callosités. On ne choisit pas des racines qui expriment ce phénotype (Khlifi et al., 2009).

En 2009, Belabasi et Benouaret ont sélectionné 8 lignées racinaires à haut rendement, sur un total de 64, affichant un taux de croissance très élevé et une ligne de départ pour le développement intéressante, Harfi (2009) a sélectionné 13 lignées racinaires réussites, quatre lignées de *Datura stramonium*, poussant bien, n'ayant pas formés de cals, ayant un taux de croissance, un degré de ramification et une longueur élevée (tableau 07).

Tableau 7: Lignées racinaires sélectionnées après 12 jours de culture sur milieu MS de *Datura stramonium* (Harfi, 2009).

<i>Datura stramonium</i>	Longueur totale (cm)	Vitesse moyenne de croissance (cm/jour)	Ramification
DS 02	11,16 ± 1,25	0,93	Ramifiée
DS 07	7,33 ± 1,52	0,61	Peu ramifiée
DS 18	11,83 ± 0,76	0,98	Ramifiée
DS 29	7,00 ± 1,00	0,58	Peu ramifiée

Les travaux de Harfi (2012) ont montré que sur un total de 343 lignées de chevelus racinaires, les meilleures lignées issues de la transformation génétique de *Datura stramonium* retenues sont caractérisées par une longueur totale moyenne de 20.8 ± 1.3 cm, une vitesse moyenne de croissance égale 1.04 cm/jour et une très bonne ramification avec le PS= 0.205 ± 0.002 g et des teneurs élevées en hyoscyamine (8.16 ± 0.613 mg/g M.S.) (Figure 08).

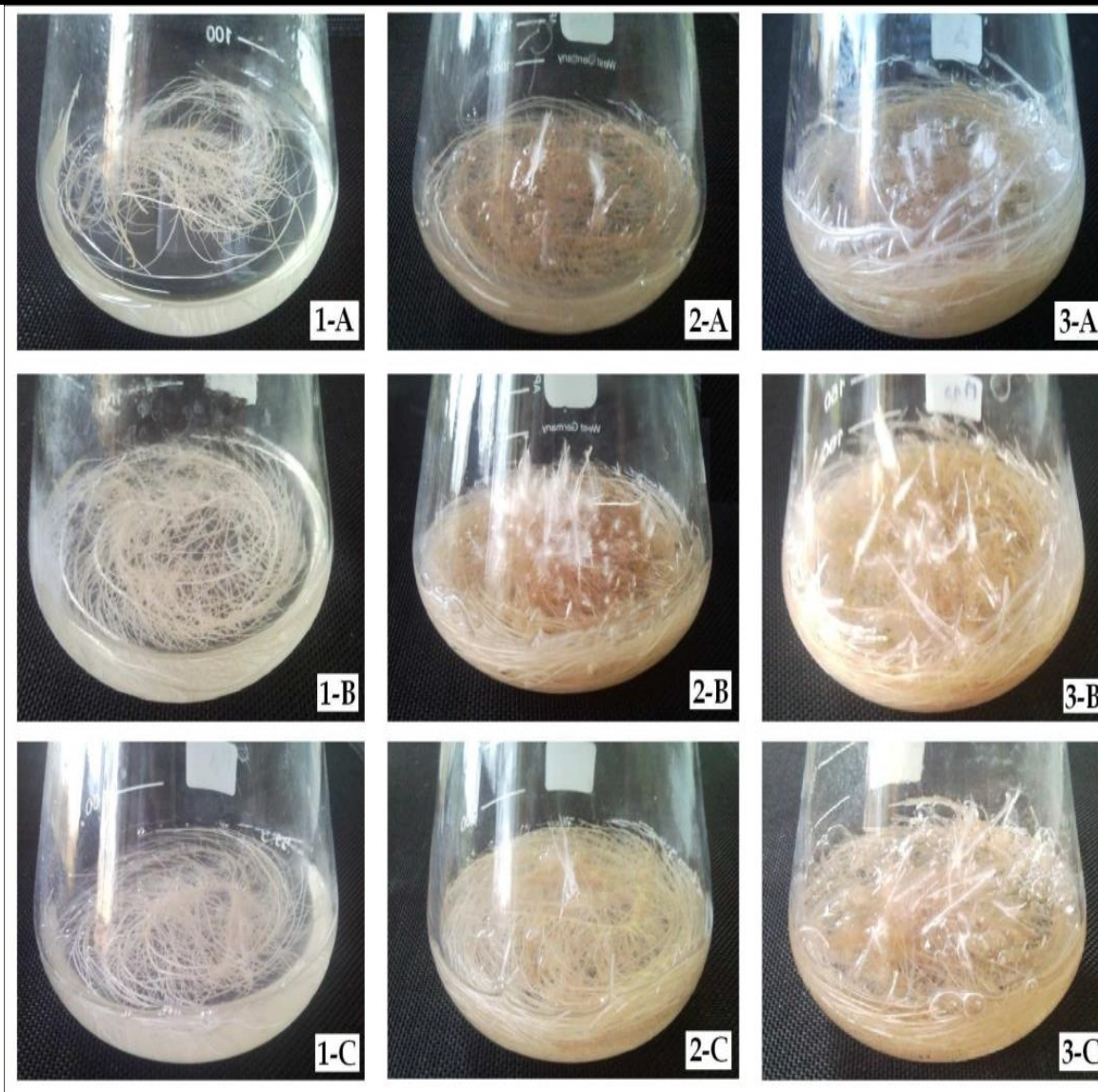


Figure 8: Biomasse des lignées retenues cultivées dans le milieu B5 liquide ($G.=0.44x$) ;
1 : 10 jours, 2 : 20 jours et 3 : 26 jours de culture. A : LDS, B : LDT et C : LDI (Harfi, 2013).

Les résultats du screening chimique réalisés sur les graines de *Datura stramonium L.* par **Ben Bordi et Hezla (2016)**, ont rassemblés 106 racines obtenues avec la souche A4, 28 lignées ont été sélectionnées, quatre lignées parmi les 28 ont été retenues pour étudier leur croissance et leur contenu en alcaloïdes totaux, il s'agit de AKI, AK2, AZKI et AZK2 dont la croissance ainsi que le contenu en alcaloïdes totaux sont élevés. Les lignées sélectionnées présentent des croissances et des contenus alcaloïdiques qui diffèrent d'une lignée à une autre malgré leur origine unique et leur induction par la même souche bactérienne A4. Aucune présence d'alcaloïdes n'a été détectée dans les milieux de culture.

IV. Evolution de la biomasse des chevelus racinaires (cinétique de croissance)

Selon l'étude réalisée par **Harfi (2013)** sous le thème "Etablissement d'un procédé biotechnologique pour la production de l'hyoscyamine chez *Datura sp.*", l'allure générale des courbes de croissance obtenues peut être décomposée en trois phases de développement. Le modèle de croissance des chevelus racinaires est sensiblement le même pour les trois lignées sélectionnées.

La première phase [les premiers jours de culture jusqu'à 10^{ème} jour] c'est la phase d'adaptation des lignées aux conditions de culture qui coïncide avec la phase de latence (**Baiza et al., 1998**). Puis la deuxième phase s'étalant jusqu'au 20/22^{ème} jour de culture, les poids secs enregistrés sont respectivement de 0,218, 0,239 et 0,298 g par 50 ml de milieu de culture B5, sachant que la quantité de chevelus racinaires introduite au départ dans chaque récipient est la même pour les trois lignées.

La dernière phase, est la phase stationnaire de croissance caractérisée par un poids sec constant. Elle commence au 20^{ème} jour pour la lignée LDT (lignée de *Datura tatula*), et au 22^{ème} jour pour les lignées LDS (lignée de *Datura stramonium*) et LDI (lignée de *Datura innoxia*). La **figure 09** illustre l'aspect de chacune des trois lignées sélectionnées et cultivées dans des Erlenmeyers, contenant le milieu B5 liquide, au 10^{ème}, 20^{ème} et 26^{ème} jour de culture.

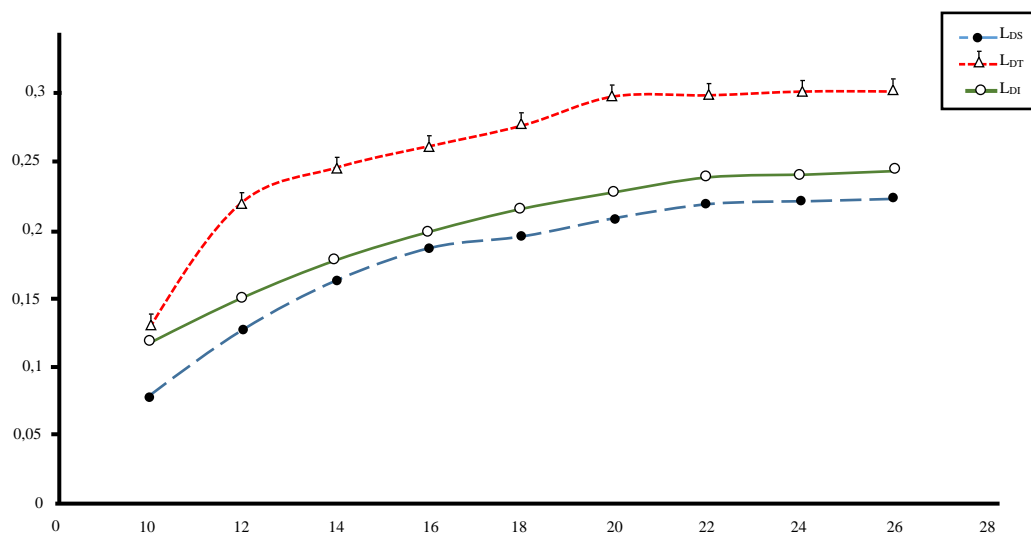


Figure 9: Cinétique de croissance des chevelus racinaires (**Harfi, 2013**).

Zarouri (2012) a aussi déterminée la cinétique de croissance des chevelus racinaires mais ses résultats sont différents de ceux de **Harfi (2013)**, la première phase de cycle de croissance correspond aux deux premiers jours de culture et présente une absence ou

Deuxième Partie: Résultats et interprétations

faible augmentation de la biomasse , la deuxième phase s'étale de 5^{ème} au 15^{ème} jour et présente une forte vitesse de croissance et atteint le maximum au 15^{ème} jour d'incubation (0.26 g MS/flacon), la dernière phase commence à partir de 15^{ème} jour c'est la phase stationnaire (reste stable et sensible).

En **2019**, sur la base des résultats de **Mousous**, dans ses travaux sur l'effet de l'élicitation sur la croissance et la production d'alcaloïdes tropaniques des chevelus racinaires de *Datura sp.* Les résultats montrent que le suivi de la biomasse en cours de culture, varie selon la souche et l'année de culture, ainsi, les chevelus racinaires DT avait l'efficacité de croissance la plus élevée en 5 ans de culture. Les meilleurs résultats sont obtenus dans la première année de choix de trois chevelus racinaires. Pour cette première année 2009, la lignée DT a produit 0.295 g MS par rapport aux deux autres lignées DS et DI avec respectivement 0.205g MS et 0.229 g MS. A la deuxième année de culture, une chute de croissance a été remarquée pour les trois lignées. En effet des pertes de poids de 42%, 12% et de 62% ont été enregistrées pour DS, DT et DI respectivement en comparaison avec les valeurs de la première année. La croissance des trois lignés est moins importante qu'à la première année de leur induction.

La chute de croissance continue en troisième, quatrième et cinquième année de culture pour les lignées racinaires DS DT et DI pour atteindre les minimums de 0,200g MS chez la lignée DT, 0,088g chez DI et 0,076g MS chez DS à la dernière année, soient des pertes de 47%, 195% et de 172% chez DT, DI et DS respectivement. Ainsi plus les lignées prennent de l'âge plus leur croissance diminue.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

D'après la recherche bibliographique, la plante *Datura stramonium* est l'une des plantes toxique pour l'homme et les animaux. Certaines des exigences thérapeutiques de la vie humaine peuvent être couverts par les poils absorbants intéressants de *Datura* qui résultent de la transformation par la souche A4 des rhizomes connus sous le nom de taux de production d'hyposomnie et de scopolamine. Les cultures de chevelus racinaires offrent la promesse d'améliorer la production et la productivité des métabolites secondaires utilisés en pharmacologie (**Srivastava et Srivastava, 2007**) De là, nous concluons que les rhizomes sont utilisés dans la transformation génétique de *Datura stramonium* pour produire des métabolites secondaires d'importance thérapeutique.

Référence
Bibliographique

Référence Bibliographique

- **Akkache N et. AliliF.**, 2015, Production in vitro d'alcaloïdes indoliques d'intérêt pharmaceutique à partir de tissus transgéniques de *Peganum harmala L.* Thèse Ingénieur. École National Supérieur Agronomique El Harrach – Alger. PP 1-14 30.
- **Alexander J., Benford D., Cockburn A., Cravedi J., P., Dogliotti. E, Di Domenico A., FernandezCruz M. L., Fürst P., Fink-Gremmels J., Lodovico Galli C., Grandjean P., Gzyl J., Heinemeyer G., Johansson N., Mutti A., Schlatter J., Van Leeuwen R., Van Peteghem C. et Verger P. 2008** - Tropane alkaloids from *Daturasp.*, as undesirable substances in animal feed. The EFSA Journal: 691, 55 p
- **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., Khelifi L. Zarouri B., Slaoui M., Amroune S., (2006).** Production de chevelus racinaires chez deux espèces de *Datura* par transformation génétique in vitro. Revue Biotechnologies végétales. 00 7-9.
- **Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Benyoussef E.-H., Dao Vu Thi, Assaf- Ducrocq C., Gontier E., 2009.** Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium 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-Saloui M., Amroune S. et Khelifi L, 2005a.** L'éllicitation : outil incontournable pour optimiser la production des alcaloïdes tropaniques in vitro. Acte du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales (INA) : 156-157
- **Amdoun R., Khelifi-Slaoui M., Amroune S. et Khelifi L, 2005b.** Ressources génétiques des *Datura* en Algérie. Acte du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales (INA): 212-213.
- **Arouko H. 2003.***Datura stramonium.* Ann. Med. Int. 154, pp1546-1550
- **Arouko H., Matray M.D., Branca C., Mpaka J.P., Chinello L., Castaing F., Bartou C. et Poisot D., 2003** - L'intoxication volontaire par l'ingestion de *Datura stramonium.* Ann. Med. Interne, 154: 1 46 - 150.

Référence Bibliographique

- **Avery., 1987. Harfi B., 2013.** induction de chevelus racinaires par *Agrobacteriumrhizogenes* chez *Datura sp*: Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biotechnologies végétales. Ecole National superieur Agronomique EL-HARRACH - ALGER, p 29.
- **Bahaz M et Rachdi H, 2010.** « Quantification des principes actifs (Les composés phénoliques) de *Rhazinolepis Lonadoides* Coss (Tichert) », Mémoire de fin d'étude d'ingénieur (université de Ouargla), pp -4-5.
- **Bakiri N. (2007)** . Prospection de la diversité génétique et quantification des alcaloïdes chez quelques provenance algériennes de *Datura stramonium L* .(EL HARRACH _ ALGER) 34.35 p.
- **Bassard et Cuisance, 1984.** Arbres et arbustes d'ornement des régions tempérées et méditerranéennes. Ed. Technique et documentation Lavoisier, Paris. 569p.
- **Belabbassi, O. (2012).** Etude de l'effet de la polyploïdisation sur la teneur en hyoscyamine des chevelus racinaires de *Datura stramonium L* (Doctoral dissertation),.PP 27_28_42.
- **Ben Bordi, A., et Hezla, M. (2016).** Contribution à l'étude d'une plante toxique la Stramoine (*Datura stramoniumL.*) dans la Wilaya D'El OUED. PP 1-70.
- **Benouadah, Z. (2009)** .Etude de l'effet de la toxicité du *Datura stramonium L* . sur le rein du rat blanc (Albinos Wistars).P 1
- **Bensaddek L, Villarreal ML, Fliniaux MA(2008)** Induction and growth of hairy roots for the pro- duction of medicinal compounds. Electron J Integr Biosci 3(1):2-9.
- **Berkov.S. et Philipov.S, 2002-** Alkaloid Production in Diploid and Autotetraploid Plants of *Datura stramonium*. Pharmaceutical Biology, 40 (8) : 617-621.
- **Bever B. 1983.** Medicinal plants in tropical west Africa II. Plants acting on the nervous system. Journal of Ethno pharmacology, 7; 1-93.
- **Bianchini F. et Pantano A C., 1986.** Guide vert des plantes et des fleurs. Édition Solar.125p
- **Bianchini F., 1975** - Guide vert des plantes et des fleurs- Edit SOLAR. 125
- **Bianchini F., Corbetta F., 1975.** Atlas des plantes médicinales. Ed. Fernand Nathan, Paris, 120 P
- Biotechnology advance,18 (1), pp.1-22.

Référence Bibliographique

- **Boitel-Conti M., Gontier E., Laberche J.C., Ducrocq C. & Sangwan-Norreel B.S., 1995.** Permeabilization of *Datura innoxia* hairy root for releas of stored tropane alkaloids. *Planta medica*, 61(3): 287-289.
- **Bonnier G., Douin R. 1990.** La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier. Edition bellin, Paris, pp 817-818.
- **Boulos L., 1983** - Medicinal plant of north Africa- Serie medicinal plant of the worle. 164.
- **Bourgoud F., Gravot A., Milesi S et Gontier E., 2001.** Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science* 161 (5), pp.839_851.
- **Bouzidi A., Mahdeb N., Allouche L. et Houcher B., 2002** - Etude épidémiologique sur les plantes toxiques dans les régions de Sétif et Bordj Bou Arreridj (Est de l'Algérie- Afrique du Nord). *Bull. Information toxicol.*, 18 (2): 5 - 10.
- **Bremness L. 2005.** Plantes aromatiques et médicinales. Edition Larousse, Paris, p 246.
- **Brothaerts W.; Mitchell H.; Weir B .; Kaines S.; Smith L.; Yang W.; Mayer J.; Guez C. et Jefferson R., 2005.** Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, 433. p.p.: 629-633.
- **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Edition tec et doc, Paris, pp783-823.647- 673
- **Bruneton J., 1995.** Pharmacognosy, Phytochemistry medicinal plants. Ed. Lavoisier, Paris, 915p.
- **Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, Spano L, Capone I, Costantino P (1987a)** Agrobacte- rium rhizogenes T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol Gen Genet* 209(3):475-480
- **Casanova E.; Trillas M.I.; Moysset L. et Vainstein A., 2005.** Influence on rol genes in floriculture. *Biotechnology Advances*, 23. p.p.: 3-39.
- **Casse F. et Breitler J.C., 2001.** OGM : description, méthodes d'obtention, domaines d'application. Ed. France agricole. Paris. 166p.
- **Cazin, F., et Cazin, H. (1997).** Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes. (3 ème éd). Mane: Edition de l'Envol.
- **Cecchini T., 1976.** Encyclopédie des plantes médicinales. Ed. De Vecchi, 327 p.

Référence Bibliographique

- **Chalandre M-C., 2000.** Éléments de Botanique. Cours de première année de Pharmacie (année 1999-2000). UFR de Pharmacie et Ingénierie de la Santé – ANGERS. pp-7.
- **Chan K., 2002-** Jimson Weed poisoning – A Case Report. The Permanente journal; 6: 28 - 30.
- **Chavarri M, García AV, Zambrano AY, Gutiérrez Z, Demey JR., 2010.** Insertion of *Agrobacterium rhizogenes* rolB gene in Mango. *Interciencia* 35(7):521–525
- **Chopra I., Abrol B., Handa K. 1960.** Les plantes médicinales des régions arides. Unesco. pp. 31-33.
- **Cordell A.G., Quinn-Bettie L.M., Fransworth N.R., 2001.** The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother*, vol. 15, p.p. : 183 – 205.
- **Costantino P.; Capone L. ; Cardarelli M.; De-Paolis A. ; Mauro M.L. et Trovato M., 1994.** Bacterial plant oncogene: the rol genes' saga.. *Genetica*, 94. p.p.: 203-211
- **Currier T. C. et Nester E. W., 1976.** *J. Bacteriol.*, vol. 126, 157 P.
- **Dangoumau J. Moore N., Molimard M., Reglat A.F., Latry K., Haramburu F. Salame G. M., Titier K. 2006.** *Pharmacologie générale. Edition 2006.* ISBN N° 2-909176-24-X. pp174, 272-273.
- **Davet P., 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. Ed. INRA Paris. 383p
- **De Cleene, M., and De Ley, J. 1976.** "The host range of crown gall." *Bot. Rev.* 47 : 147-194.
- **Deng F. 2005.** Effects of glyphosate, chlorsulfuron, and methyl jasmonate on growth and alkaloid biosynthesis of jimsonweed (*Datura stramonium L.*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82, 16-26.
- **Devi M., Bawari M., Paul S., Sharma G. 2011.** Neurotoxic and Medicinal Properties of *Datura stramonium L.* *Journal of Science et Technology* Vol. 7 N° 1; 139-144
- **Dhakulkar , S. , Ganapathi , T. , Bhargava , S. , and Bapat , V. (2005) .** Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb . and production of verbascoside in hairy roots . *Plant science* 169 , 812-818 .
- **Dicosmo F. et Misawa M., 1995.** Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology advances*, 13(3): 425-445

Référence Bibliographique

- **Doncheva T., Berkov S., Philipov S. 2006.** Comparative study of the alkaloids in tribe Datureae and their chemosystematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 34; 478-488.
- **Doran PM., 2002.** Properties and applications of hairy root cultures. In: Marja K, Caldentey KM, Barz W (eds) *Plant biotechnology and transgenic plants*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 1-20.
- **Dörneburg., 2004. AKKACHE N., 2015.** Production in vitro d'alcaloïdes indoliques d'intérêt pharmaceutique á partir de tissus transgéniques de *Pegnum hamlaa L.* Mémoire En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur. Ecole National Supérieur Agronomique EL-HARRACH - ALGER, p 30, 31.
- **Dorvault F., 1982 -** L'officine du 21 ème siècle . Ed. Vigot. 5000p.
- **Drager B. 2002.** Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 978; 1–35.
- **Eddouks M., Maghrani M., Lemhadri A., Ouahidi M.-L., Jouad H. 2002.** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). *Journal of Ethnopharmacology* 82, 97-103.
- **Eftekhar F., Yousefzadi M., Tafakori V. 2005.** Antimicrobial activity of *Datura innoxia* and *Datura stramonium* .*Fitoterapia* 76, 118– 120
- **Egharevba R K A., Ikhatua MI. 2008.** Ethno- Medical Uses of Plants in the Treatment of Various Skin Diseases in Ovia North East, Edo State, Nigeria. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(1), pp 58-64.
- **El Bazaoui A., Stambouli H., Bellimam M. A., Soulaymani A. 2009.** Détermination des alcaloïdes tropaniques des graines du *Datura stramonium L.* par CPG/SM et CL/SM. *Ann Toxicol Anal.*; 21(4): 183-188
- **Evans D.E., Coleman J.O.D et Kearns A.,2003.**Plant cell culture. Ed. BIOS Scientific Publishers, 194p.
- **Evans WC. Trease and Evans pharmacognosy. 14 ed. London: WB Saunders; 1996.**
- **Fabre R., Truhaut R. 1961.** Précis de toxicologie. Tome 2. Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, pp 379-454

Référence Bibliographique

- **Felidj, M. (2005).** Effet du stress hydrique sur la production des alcaloïdes tropaniques chez *Datura stramonium* cultivé en plein champ (Doctoral dissertation, Blida).PP, 11-20
- **Flesch F. 2005.** Intoxications d'origine végétale : Plant poisoning. EMC-Médecine 2, pp 532–546
- **Flores H.E., Vivanco J. M. Loyola-Vargas V. M.1999.** Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. Reviews, Vol. 4, No. 6.
- **Fredman M et Levin C.E., 1989-** Composition of jimson weed seeds- J. Agric. Food. Chem., 37 : 998-1005..
- **Ghedjati, N. (2014).** Toxicité aigüe et subaigüe des alcaloïdes naturels et synthétiques des graines du *Datura stramonium*. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister en Biologie en Biochimie. P 1.
- **Gidado A., Zaineb A. A., Hadiza M. U., Serah D. P., Anas H. Y., Milala M. A. 2007.** Toxicity studies of ethanol extract of the leaves of *Datura stramonium* in rats. African journal of biotechnology.vol. 6 (8), pp 1012-1015
- **Giri A et Narasu M.L., 2000.** Transgenic hairy roots : recent trends and applications . biotechnology advances, 18(1), pp. 1-22.
- **Gobbi, R., et Khebbaz, W. (2014).** Traçabilité de l'identification des métabolites secondaires végétaux. Mémoire de Licence, Université kasdi merbah d'Ouargla, Algérie.pp 27.
- **Gouille JP., Pepin G., Dumester-Toulet V. Et Lacroix C., 2004.** Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. Annales de Toxicologie Analytique, 16 (1), 34p.
- **Grevoz G. D., Laubriet A. 2007.** Reconnaissance et préparation de médicaments à l'officine. Edition Maloine, Paris, p 18
- **Gryniewicz G., Gadzikowska M. 2008.** Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. Pharmacological reports 60, 439-463
- **Guignard J. L. 2000.** Biochimie végétale. 2ème édition. Edition Dunod, Paris, pp 198-207
- **Guignard J. L., Cosson L., Henry M. 1985.** Abrégé de phyto-chimie. Masson, Paris, pp 175-191.

Référence Bibliographique

- **Guillon S., Tremouillaux -Guiller J., Pati K.P., Rideau M et Gantet P., 2006.** Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, pp.341-346.
- **Hadjimi, G. (2011).** Production d'alcaloïdes in vitro à partir de tissus de *Datura stramonium L.* et effet sur la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* (Killian et Maire) WL Gordon (Doctoral dissertation). PP,23
- **Halpern J., Sewell R. 2005.** Hallucinogenic botanicals of America: A growing need for focused drug education and research. *Life Sciences* 78; 519 – 526
- **Hamill J.D., Parr A.J., Robins R.J., Rhodes M.J.C., 1986.** Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, vol. 5, p.p. : 111–115.
- **Harfi B. , 2013.** Etablissement d'un procédé biotechnologique pour la production de l'hyoscyamine chez *Datura sp.* ENSA-ALGER. pp, 1-70-32
- **Harfi, B. (2009).** Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura sp.* Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes (Doctoral dissertation, Thèse Magistère ENSA, El Harrach Alger). pp 11-48-49-51.
- **Hartmann T. 2007.** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831-2846.
- **Hilton W.G., Wilton P.D.G., 1995.** *Growth and uptake of sucrose and mineral ions by transformed root cultures of Datura stramonium, Datura candida x aurea, Datura wrightii, Hyoscyamus muticus and Atropa belladonna.* *Planta Med.*, vol. 61, p.p : 345-350.
- **Hooykaas P.J.J.; Hoficer M.; Den Dulk - Ras H. et Schilperoort R.A. , 1984.** A comparison of virulence determinants in an octopine Ti plasmids, a opalines Ti plasmids, and an Ri plasmide by complementation analysés of *Agrobacterium tumefaciens* mutants Plasmid, 11. p.p.: 195-205.
- **Hopkins W.G., 2003.** *Physiologie végétale.* Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 514P.
- **Houdé A., 1985** - Pérennité des alcaloïdes- Edit. L. PARIENTE. Paris. pp 13 .
- **Houmani Z., Cosson L. and Houmani M. (1999).** *Datura ferox L.* and *Datura quercifolia* Kunth (solanaceae) in Algeria. *Flora mediterranea.* 9 :57-60.

Référence Bibliographique

- **Houmani, Z, 1999.** Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Thèse de Doctorat. INA El-harrach, Algérie, 124p.
- **Huffman G. ; White F. F.; Gordon M. P. et Nester E. W., 1984.** Bacteriology. J. Bacteriol., 157. 269p.
- **Iranbakhsh A., Oshaghi M., MAJD A. 2006.** Distribution of atropine and scopolamine in different organs and stages of development in *Datura stramonium L.* (solanaceae). Structure and ultrastructure of biosynthesizing cells. Acta biologica cracoviensia series botanica 48/1: 13-18.
- **Jardin., 1991. AKKACHE N., 2015.** Production in vitro d'alcaloïdes indoliques d'intérêt pharmaceutique á partir de tissus transgéniques de *Pegnum hamlaa L.* Mémoire En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur. Ecole National Supérieur Agronomique EL-HARRACH - ALGER, P 30, 31.
- **Jha T,B et Ghosh B.,2005.** Plant tissue culture :basic and applied. 1 st Ed. Universiries Press, New Delhi, 206p.
- **Jordan M., Humam M., Bieri S., Christen P., Poblete E., Munoz O. 2006.** In vitro shoot and root organogenesis, plant regeneration and production of tropane alkaloids in some species of *Schizanthus*. Phytochemistry 67, 570-578.
- **Kang S. M., Jung H. Y., Kang Y. M., Yun D. J., Bahkb J. D., Yang J. k., Choi M. S. 2004.** Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. Plant Science 166; 745-751.
- **Kenneth J. Broadley D. et Kelly R., 2001 -** Muscatine Receptor Agonists and Antagonists. Molecules 6, 142-193.
- **Kerstens K. et De Ley J., 1984.** Genus III. *Agrobacterium*. N.R. Krieg et J.G. Holt. Baltimore: Williams et Wilkins, 1. p.p.: 244-254.
- **Khelifi L., Harfi B. Amdoun R., Morsli A., Zaoui D. et 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.* Laboratoire Ressources Génétiques et biotechnologies, ENSA (ex-INA), Alger. P.1000-1004.

Référence Bibliographique

- **Kim Y.J., Wyslouzil B.E., Weathers R.J., 2002.** Invited review : secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. In *Vitro Cellular et Developmental Biology*, vol. 38, p.p. : 1 – 10.
- **Kim YJ, Weathers PJ, Wyslouzil BE., 2002 .**The growth of *Artemisia annua* hairy roots in liquid and gas phase reactors. *Biotechnol Bioeng* 80:454-464
- **Knorr., 1995. Akkache N., 2015.** Production in vitro d'alcaloïdes indoliques d'intérêt pharmaceutique á partir de tissus transgéniques de *Pegnum hamlaa* L. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur. Ecole Nationale Supérieure Agronomique EL-HARRACH - ALGER, p 30, 31.
- **Konarev A., Griffin J., Konechnaya G., Shewry P. 2004.** The distribution of serine proteinase inhibitors in seeds of the Asteridae. *Phytochemistry* 65; 3003–3020. Sanjita D., kumar P., Basu S. 2012. Phytoconstituents and therapeutic potentials of *Datura stramonium* Linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* 2(3): 4-7.
- **Kovalenko P.G. and Maliuta S.S. (2003).** An effect transformation by Ri-plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production. *Ukr. Bioorg. Acta* 1 (1):50-60.
- **Kresanek J., 1981-** les plantes médicinales- éd. Boudouin, Paris. 222.
- **La Rouse. 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparations, soins. Edition la Rouse, Paris. pp 199-200.
- **Lailheugue, P. (1983).** La stramoine: *Datura stramonium* Linné, son usage, ses effets. Th: Pharm : Bordeaux, 66.
- **Lanoue A., Shakourzadeh K., Marison I., Laberche J-C., Christen P., Sngwan-Norreel B. Et Boitel-Conti M., 2004.** Occurrence of circadian rhythms in hairy root cultures grown under controlled conditions. *Biotechnology and bioengineering*, , 88, 6: 722-731.
- **Lapostolle F. et Flesh F. 2006** -Particularités des nouvelles drogues. *Réan.*, 15: 412 – 417
- **Lee K.T., Yamakawa T., Kodama T. et Shimomura K., 1998.** Effects of chemicals on alkaloids production by transformed roots of *Belladonna*. *Phytochemistry*, 49(8): 2343-2347.

Référence Bibliographique

- **Lee S, Blackhall NW, Power JB, Cocking EC, Tepfer D, Davey MR., 2001.** Genetic and morphological transformation of rice with the rolA gene from the Ri T, - DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Sci 161:917–925.
- **Liang Y., Aoyama T. et Oka A., 1998.** Structural characterization of the *virB* operon hairy-root-inducing plasmid A4. DNA research. 5: 85-93.
- **Marc B. J. 2000.** *Daturas*, plantes magiques hallucinogènes, et médicinales à l’Ile de la réunion et dans le monde. Thèse de docteur en médecine. Université d’Henri Poincare, Nancy. France. pp 11 .
- **Mauro N.M., 2006.** Synthèse d’alcaloïdes biologiquement actifs : la (+) anatoxine-a et la (±) camptothécine. Th. Doctorat, université Joseph Fourier - GRENOBLE 1, 186 P.
- **Mechler E et Kohlenbach H.W., 1978 -** Alcaloïd content in leaves of diploid and haploid *Datura* species- *Planta Medica*. 33 : 350- 355.
- **Miraldi E., Mastib A., Ferria S., Comparinib I. 2001.** Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* 72; 644-648.
- **Mohajjel Shoja H., 2010.** Contribution à l’étude des gènes plast *d’Agrobacterium rhizogenes*, rolB et rolC, et de leurs homologues chez *Nicotiana tabacum* (Thèse de doctorat, Strasbourg).pp 28 .
- **Montcriol A., Kenane N., Delortb G., Asencio Y., & Palmier B., 2007 -** Intoxication volontaire par *Datura stramonium* : une cause de mydriase mal connue. *Annales Françaises d’Anesthésie et de Réanimation* 26, 810–813.
- **Morsli A, 2013.** Caractérisation de la diversité génétique de quelques espèces de *Datura L.* en Algérie., thèse de doctorat, Université Mouloud Maameri de Tizi Ouzou, pp: 5.
- **Mountain L. 1987.** Jimsonweed, *Datura stramonium L.* Solanaceae. Regulatory horticulture weed circular. Vol. 13, No.1. (a6). _Richard D., Senon J. L. 2001. Dictionnaire des drogues, des toxicomanies et des dépendances. Edition Larousse, Paris, p54.
- **Moussous, A. (2019).** Effet de l’éllicitation sur la croissance et la production d’alcaloïdes tropaniques des chevelus racinaires de *Datura sp* (Doctoral dissertation). pp -1.
- **Mukundan U., Rai A., Dawda H., Ratnaparkhi S., Bhide V., 1998.** Secondary metabolites in *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root cultures. *Plant*

Référence Bibliographique

Tissue Culture and Molecular Biology Applications and Prospects, New Delhi House, p.p. : 302 – 333.

- **Murashige T. et Skoog F. , 1962. ,** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures . *Physiologia Plantarum* , 15 : 473-497 .
- **Murugesan S.; Manoharan C.; Vijayakumar R. et Panneerselvam A., 2010.** Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. *International Journal of Microbiological Research*, 1(3). p.p.: 92-96.
- **Nader BL, Taketa AT, Pereda-Miranda R, Villarreal ML. 2006.** Production of triterpenoids in liquid-cultivated hairy roots of *Galphimia glauca*. *Planta Med* 72:842-844.
- **Namdeo A.G., 2007.** Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1): 69-79.
- **Nilsson O, Olsson O., 1997.** Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant* 100:463-473
- **Nsemi, F. M. (2012).** Problématique de la malnutrition en Afrique Subsaharienne: Contribution à l'étude des valeurs nutritionnelles des aliments:" cas de quelques chenilles consommées à Kinshasa". Editions universitaires europeennes.
- **Oksman-Caldentey KM., KivelaE O., Hiltunen R. 1991.** Spontaneous shoot organogenesis and plant regeneration from hairy root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Sci* 78:129–136
- **Ono, N. N., and Tian, L., 2011.** The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Science* 180, 439-446
- **Palazón J., Navarro-Ocaña A., Hernandez-Vazquez L et Mirjalili M.H., 2008.** Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. *Molecules*,13, pp.1722-1742.
- **Paolo, M. (2001).** Antihelminthic traditionnelle, les utilisations antiparasites et répulsives des plantes en Italie centrale. *J Ethnopharm*, 68 (1-3), 183-192.
- **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.

Référence Bibliographique

- **Paris. et Moysse H., 1991.** Les solanacées médicinales. Matière médicale. 3^{ème} édition. Masson et Cie édit. Paris. pp-5.
- **Park, S.U. and Facchini P.J. (2000).** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham. Root cultures. *J. of Exper.bot.* (51) 347:1005-1016.
- **Paul F. White., Jun Tang., Dajun Song., Jayne E. Coleman., Ronald H. Wender., Babatunde O., SloninskyA., Rajani Kapu., Shah M. et Tom Webb. 2007 -** Transdermal scopolamine: An alternative to ondansetron and droperidol for the prevention of postoperative and post discharge Emetic Symptoms. *International Anesthesia.* Vol.104, No.1.
- **Payane J., Hamill J.D., Robins R.J et Rhodes M.,1987.** Production of Hyoscyamine by 'Hairy Root' Cultures of *daturastramonium*; *Planta Medica*, 53 (5), pp.474-478.
- **Perry J.J., Staly J.T. Et Loru S., 2004.** Microbiologie. Ed. Dunod. 891p.
- **Poletti A., 1987.** Fleurs et plantes médicinales. Ed. Délachaux et Niestlé, Paris. 192p.
- **Pras., 1991. Harfi B., 2013.** induction de chevelus racinaires par *Agrobacteriumrhizogenes* chez *Daturasp*: Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biotechnologies végétales. Ecole National superieur Agronomique EL-HARRACH - ALGER, p 29.
- **Prescott L.M.; Harley J.P. et Klein D.A., 2003.** Microbiologie. Ed. De boeck, Paris. 1137p.
- **Pretorius P., Marx J., 2006.** *Datura stramonium* in asthma treatment and possible effects on prenatal development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21 (3):331-337.
- **Pujol M., Villain M., Vallet G., Cirimele V., Kintz P, 2006.** Scopolamine : un nouveau cas de soumission médicamenteuse sur des enfants. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. 18, n° 3
- **Quezel P. et Santa S., 1962.** Nouvelle flore d'Algérie. Ed. C.N.R.S, Paris.
- **Quezel P. Et Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des zones désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS. Paris. 1170 p.
- **Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavarz T., 2003.** Elicitation of plant and microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol.37, p.p.:91-102.

Référence Bibliographique

- **Ramachandra Rao S, Et Ravishankar G.A., 2002.** Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- **Rao SR, Ravishankar G., 2002.** Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 20:101–153.
- **Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., 2000.** *Biologie végétale*. Ed. De Boeck Université, Paris, 944 P.
- **Reichl, Benecke J., Benecke M., Eckert K. G., Erber B., Golly C., Kreppel H., Liebel B., Muckter H., Szinicz L., Zilker T. 2004.** *Guide pratique de toxicology*. Edition de boeck, Bruxelles, pp 62-63, 258-259.
- **Rhodes M.J.C.; Robins R.J.; Hamill J.D.; Parr A.J.; Hilton M.G. et Walton NJ. , 1990.** Properties of transformed root cultures. *Clarendon Press, Oxford*. p.p. : 201-225
- **Richter G., 1993,** *Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie*.éd. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 526 p.
- **Riseuleo G.; Battistoni P. et Costantino P., 1982.** *Plasmid*, 7, 45p.
- **Roberts F.M. , 1998.** Production of alkaloids in plant cell culture. In Roberts F.M et Wink M (eds). *Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal application*. Ed.Plenum press, New York, pp.159-194.
- **Roberts M F., Wink M., 1998.** *Alkaloids, biochemistry, ecology and medicinal application*. Ed. Plenum Press, New York, p.p.: 1 - 7.
- **Sanjita D., kumar P., Basu S. 2012.** Phytoconstituents and therapeutic potentials of *Datura stramonium* Linn. *Journal of Drug Delivery et Therapeutics* 2(3): 4-7.
- **Sasson A, 1991.** Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological economic aspects. *Option méditerranées – série séminaire*. 14 : 59-74.
- **Schauer T et Caspari C., 2007.** *Guide Délachaux des plantes par la couleur*. Ed. Délachaux et Niestlé. p 495.
- **Schell J., Van Montagu M., Depicker A., DeWaele D., Engler G., Genetello C., Hernalsteens J.O., Holsters M., Messens E., Silva B., Van den Elsacken S., Van Larabeke N. et Zaenen I. 1976.** *Plants: Nucleic Acids and Protein Synthesis*. Ed.L. Bogorad and J. H. Weil, New York: Plenum Press, p. 329.
- **Scriban R., 1999.** *Biotechnologie*. Ed. Techniques et documentation. Paris. 1042p.

Référence Bibliographique

- **Sevon N, Oksman-Caldentey KM., 2002.** *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med* 68:859-868
- **Sheng J. et Citovsky V., 1996.** *Agrobacterium* - plant cell interaction: have virulence proteins - will travel. *Plant Cell*, 8. p.p.: 1699-1710. Shukla Y.N. et Thakur R.S. , 1992. Tropane alkaloids from *Duboisia myoporoides*. *Phytochen*, 12 (31). p.p.: 4380-4390 .
- **Singh., 1988. Harfi B., 2013.** induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp: Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes. Mémoire En vue l'obtention du diplôme de Magister en Biotechnologies végétales. Ecole National Supérieur Agronomique EL-HARRACH - ALGER, p 29.
- **Slightom J.L., Durand-Tardif M., Jouanin L., Tepfer D. 1986.** Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J. Biol. Chem.*, vol. 261, p.p. : 108 – 121.
- **Smetanska, 2008.** Production of secondary métabolites using plant cell culture. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* P 200-211.
- **Souret F.F., Kim Y., Wyslouzil B.E., Wobbe K.K., Weathers P.J., 2003,** Scal-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and bioengineering*, 83 (6): 653-669.
- **Spano L., Mariotti D., Cardarelli M., Branca C., Costantino P., 1988.** Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA. *Plant Physiol* 87(2):479–483
- **Spichiger R.E., Savolainen V. V., Figeat M., Jeanmonod D., Perret M. 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs. 3éme édition. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, p216
- **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.
- **Stenkamp P.A., Harding N.M., van Heerden F.R., van Wyk B.-E. 2004.** Fatal *Datura* poisoning: identification of atropine and scopolamine by high performance liquid chromatography/photodiode array/mass spectrometry. *Forensic Science International* 145, pp 31–39.- 313.
- **Strahil, B., Rawia, Z., et motifs, T.(2006).** Alcaloïdes dans certaines variétés de *Daturastramonium* .*Fitoterapia* , 77 (3),179-182.

Référence Bibliographique

- **Tepfer D., 1982.** La transformation génétique de plantes supérieures par *Agrobacterium rhizogenes*. Deuxième colloque sur les recherches fruitières. Bordeaux. Ed. INR- CTIFL: 46-53.
- **Tikhomiroff C., 2001.** Etude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus roseus* en vue du développement d'un modèle cinétique. Th. maître es sciences appliquées, Génie chimique, Université de Montréal, Ecole polytechnique, 235 P..
- **Toivonen L., 1993.** Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.*, vol. 9, p.p. : 12-20.
- **Tourte Y. 1998.,** Génie génétique et biotechnologie : concepts et méthodes. Ed. Dunod. 209p.
- **Tourte Y., 2001.** Les OGM - La Transgénèse chez plantes. Dunod. 144p.
- **Vakili B., Karimi F., Sharifi M., Behmanesh M. 2012.** Chromium-induced tropane alkaloid production and H6H gene expression in *Atropa belladonna* L. (Solanaceae) in vitro-propagated plantlets. *Plant Physiology and Biochemistry* 52; 98-103
- **Veena V., Taylor C.G., 2007.** *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular et Developmental Biology*, vol. 43, p.p. : 38–403.
- **Veersham C., 2004.** In elicitation : medicinal plant biotechnology, C.B.S Publisher, India,270-293.
- **Verdrager J., 1978** - Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Le *Datura*. Ed. Maloine S.A., Paris : 96-97
- **Verpoorte R . Contina ., Memelink J.,2002,** Biotechnology for the production in plants. *Current Opinion in biotechnology* , 13:181-187.
- **Viegi L., Pieroni A., Guarrera P. M., Vangelisti R. 2003.** A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 221– 244.
- **Vitale A.A.,Acher A.Pomilio A.B., 1995,**Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 49 :81-89.
- **Wang J.W. et Wu J.Y., 2013.** Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Advances in biochemical engineering / biotechnology*, in press pp 12

Référence Bibliographique

- **Wang R., Zhou W., Hanna M., Zhang Y., Bhadury P., Wang Y., Song B., Yang S. 2012.** Biodiesel preparation, optimization, and fuel properties from non-edible feedstock, *Datura stramonium L.* Fuel 91; 182–186
- **Wei-Wei Zhang., Ming-Ke Song., Yong-Yao Cui., HaoWang., Liang Zhu., Yin-Yao Niu., Li-Min Yang., Yang Lu., Hong-Zhuan Chen (2008).** Differential neuropsychopharmacological influences of naturally occurring tropane alkaloids anisodamine versus scopolamine. Neuroscience Letters 443, 241–245.
- **White F.F. et Nester E.W., 1980.** J. Bacteriol., vol. 141, 1134 P.
- **White FF., Taylo BH., Huffman GA., Gordon MP., Nesterr EW., 1985.** Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. J Bacteriol 164(1):33–44
- **Willmitzer L.; Sanchez-Serrano J.; Busfeld E. et Schell J., 1982.** Mol. Gen. Genet., 186 16p.
- **Wink M., 1999.** Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual plant reviews, Sheffield academic press and CRC press, Volume 2, 358 P.
- **Zaha J., Davis L.C.,Verpoorte R.,2005,**Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances,23:283-333.
- **Zarouri B., 2006.** Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* sur explants de *Datura stramoniumL.* en vue d'améliorer la production d'alcaloïdes. Thèse d'ingénieur, École National Supérieur Agronomique El Harrach – Alger,PP, 2-10-11-25-32.
- **Zarouri, B. (2012).** Induction de chevelus racinaires chez trois espèces de *datura*, sélection de lignées performantes pour la production d'alcaloïdes (Doctoral dissertation),P.32.
- **Zhi-yun Z., An-ming L., D'Arcy W. 1994.** Solanaceae. Flora of China 17: 300–332.
- **Zhou X.R. et Christie P.J. , 1999.** Mutagenesis of the *Agrobacterium* VirE2 single stranded DNA-binding protein identifies regions required for self-association and interaction with VirE1 and a permissive site for hybrid protein construction. J. Bacteriol. , 181. p.p.: 4342-4352.