



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة محمد بوضياف - المسيلة

UNIVERSITÉ DE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA

Département des sciences agronomiques

MEMOIRE

En vue de l'obtention du Diplôme de Master II en Agronomie

Spécialité : Production végétale

Thème

Induction des chevelus racinaires chez *Datura* sp. en vue de production de
métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique

Présenté par :

M^{lle} SMAHI Majda

Soutenu en 2020

M^{lle} NOUFEL Ahlam

Jury :

Président : Mr. TORCHIT Nadir. MAA U.M'sila

Promotrice : M^{me}. BAKIRI Nouara. MAA U.M'sila

Examineur : Mr. KADRI Adel. MCB U.M'sila

Promotion: 2019-2020

Remerciement

Au terme de ce travail nous tenons à remercier :

*Avant tout **ALLAH**, le tout puissant qui nous a donné le courage, la force et la volonté pour accomplir notre travail*

*On exprime d'abord nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à **Mme BAKIRI Nouara**. Promotrice de ce travail, pour avoir accepté de nous encadrer, pour ses orientations, ses encouragements et pour l'effort consenti à nous faire profiter de ses connaissances.*

***Mr. TORCHIT Nadir** d'avoir accepté de présider le jury*

***Mr. KADRI Adel** d'avoir bien voulu juger notre travail*

*Nous remercions également **Mr MORSLI A, CC- ENSA** le responsable de laboratoire de foresterie et protection de la nature **ENSA –EL HARRACH ALGER** d'avoir accepté recevez-nous et fournissez-nous l'ambiance et les moyens appropriés pour terminer notre expérimentation et. Qui, malgré le peu de temps que y avons passé, nous avons appris beaucoup de choses. Sans oublier tout l'équipe et les collègues de ce laboratoire*

Nous remercions toutes nos familles, nos amis et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents ma mère et mon père

Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.

Mes frères et ma sœur et à toute ma famille.

*Mes amies et collègues et Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin
à la réalisation de ce modeste travail*

*Sans oublier tout les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du
secondaire ou de l'enseignement supérieurs.*

Et à toute la communauté scientifique.

MAJDA ☺ ☺

Dédicace

J'ai l'honneur de dédié ce modeste travail à mes chers parents auxquels je dois tout mon respect, qui m'ont dirigé et suivi pendant toute mes années d'études et surtout ma mère, mon enseignante de toujours, mon père pour leurs sacrifices de tous les moments, sa patience sans limite et l'éducation qu'il m'a donnée, Je les remercie mille fois.

*A ma grande sœur Amina ma petite sœur Hadjer et mon petit frère Islam,
A mes proches et toute ma famille A mes amis et tous les gens qui
m'aiment.*

AHLAM ☺ ☺

Résumé :

Le *Datura stramonium* est une plante médicinale intéressante avec une valeur pharmacologique, à raison de sa richesse en alcaloïdes tropaniques très recherchés, en particulier, dans l'industrie pharmaceutiques. La culture de chevelu racinaire obtenu à partir d'explants de *Datura stramonium* inoculés par l'*Agrobacterium rhizogenes* offre des perspectives pour leur production *in vitro*.

Notre travail a porté sur l'induction des chevelus racinaires par l'*Agrobacterium rhizogenes*, ainsi que sur la production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutiques à partir de ces chevelus racinaires induits; dommage nous sommes entrés en collision avec l'urgence de coronavirus, quarantaine et confinement qui a été appliquée dans notre pays, donc on n'a pas fini notre expérimentation c'est pourquoi nous avons essayé de tirer des conclusions des mémoires précédentes et les relier avec notre expérimentation.

Mots clés :

Datura stramonium, *Agrobacterium rhizogenes*, chevelu racinaire, culture *in vitro*, alcaloïdes tropaniques

Summary

Datura stramonium is an interesting medicinal plant with a value pharmacological, because of its richness in the much needed tropical alkaloids, in the pharmaceutical industry. The culture of hairy root obtained by inoculation of *Datura sp* with *Agrobacterium rhizogenes* offers promising prospects for their *in-vitro* production.

Our work has focused on the induction of root hair by *Agrobacterium rhizogenes*, as well as on the production of secondary metabolites of pharmaceutical interest to from these induced root hairs; unfortunately we collided with the emergency of corona-virus, quarantine and containment that has been applied in our country, so we didn't finish our experiment. and for this we tried to get the results out of it from conclusions of previous submissions and link them with our experiment.

Keywords:

Datura stramonium, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, *in vitro* culture, tropane alkaloids,

الملخص

هي نبتة طبية ذات أهمية كبيرة في مجال الصيدلة وعلم الأدوية نظرا لثرائها على مصدر مهم *Datura Stramoonium* باستخدام *Datura sp* جدا في القلويدات التروبانية خاصة في صناعة الأدوية. زرع الجذور المشعرة المتحصل عليها من نبات *Agrobacterium rhizogènes* تهطي آمال في إنتاجها عن طريق الزراعة الأنوبوية الهدف من هذا العمل هو تحسين إنتاج القلويدات التروبانية.

إنتاج المستقبلات الثانوية ذات *Agrobacterium rhizogènes* عملنا يتركز على حث الجذور الشعرية من طرف الأهمية الصيدلانية للأسف الشديد لقد تصادمنا مع حالة الطوارئ لوباء كورونا الحجر الصحي والمنزلي المطبق في البلاد لهذا لم ننته من إكمال تجربتنا فارتأينا إلى أن نستنبط نتائج المذكرات السابقة ومحاولة ربطها بتجربتنا .

الكلمات المفتاحية:

الجذور المشعرة، القلويدات التروبانية، الزراعة الأنوبوية، *Datura stramonium*, *Agrobacterium rhizogenes*.

Liste des abréviations

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 ;

M.S. : Matière sèche ;

mg : Milligramme ;

MII : métabolites secondaires ;

ml : millilitre ;

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

Ps : poids sec ;

rpm : Round peer minute (rotation par minute) ;

SNC : System nerveux central ;

T.H. : Teneur en hyoscyamine ;

YEM: Yeast Extract Mannitol (**Vincent, 1970**);

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des alcaloïdes trouvés dans <i>Datura stramonium</i>	11
Tableau 2 : Principales paramètres pharmacocinétiques des alcaloïdes de <i>Datura stramonium</i> chez l'homme.....	15
Tableau 3 : Taux de l'atropine et la scopolamine des différentes parties de la plante de <i>Datura stramonium</i> quantifiés par GC/ SM.....	18
Tableau 4 : Principales opines servant à la classification des plasmides Ri d' <i>A. rhizogènes</i>	24
Tableau 5 : Résumé de quelques travaux d'élicitation de la production des alcaloïdes tropaniques chez <i>Datura</i>	31
Tableau 6 : les Composition du milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962).....	36
Tableau 7 : Composition chimique du milieu YEM.....	37
Tableau 8 : Variation des taux d'induction racinaire en fonction des provenances de <i>D. stramonium</i>	43
Tableau 9 : Variation Temps moyen d'apparition de la première racine (jours) en fonction des provenances de <i>D. stramonium</i>	44
Tableau 10 : Lignées racinaires sélectionnées après 12 jours de culture sur milieu MS de <i>D. stramonium</i>	45

Listes des figures

Figure 1 : <i>Datura stramonium</i>	2
Figure 2 : Voies hypothétiques d'expansion des <i>Datura</i> sp dans le monde <i>Datura</i> sp (Bleu) et <i>Datura metel</i> (vert).....	5
Figure 3 : Différents parties de <i>Datura stramonium</i>	6
Figure 4 : structure chimique de l'atropine.....	15
Figure 5 : structure chimique de l'hyoscyamine.....	16
Figure 6 : structure chimique de scopolamine.....	17
Figure 7 : Vue d'ensemble de la voie biosynthétique d'alcaloïdes tropaniques et de la catalyse enzymatique.....	19
Figure 8 : Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin.....	21
Figure 9 : Structure du plasmide Ri.....	24
Figure 10 : Différentes applications biotechnologiques des cultures de racines transgéniqu.....	27
Figure 11 : Grains scarifiées et désinfectés (stérile).....	35
Figure 12 : le milieu MS dans les tubes et les erlenmeyers.....	36
Figure 13 : Grains cultivées dans un milieu MS posées dans la chambre de culture.....	37
Figure 14 : Activation de la souche A4.....	38
Figure 15 : Protocole de préparation de suspension bactérienne.....	39
Figure 16 : Méthode de l'infection de la Co-culture et de l'isolement des racines induites.....	41
Figure 17 : Cinétique de croissance des CRs	45
Figure 18 : Biomasse des lignées retenues cultivées dans le milieu B5 liquide.....	46

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Summary	
الملخص	
Listes des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction générale.....	1

PREMIERE PARTIE : Synthèse bibliographique

I. Généralités sur <i>Datura stramonium</i>.....	3
I.1 Présentation de <i>Datura stramonium</i>	3
I.2 Position systématique du genre <i>Datura</i> L	4
I.3 Origine et répartition.....	4
I.4 Caractéristiques de la plante.....	5
I.5 Aspect génétique de <i>Datura stramonium</i>	7
I.6 Intérêt et utilisations de <i>Datura stramonium</i>	7
I.6.1 Intérêt de <i>Datura stramonium</i>	7
I.6.2 Utilisation médicinale et traditionnel	8
I.6.3 Utilisation agricole.....	9
I.6.4 Utilisation écologique	9
I.7 Contenus alcaloïdiques de la plante.....	10
I.7.1 C'est quoi un alcaloïde	10
I.7.2 Teneur en alcaloïdes totaux fonction des organes.....	10
I.7.3 Diversité des alcaloïdes chez <i>Datura stramonium</i>	10
II. Métabolites secondaires	13
II.1 Intérêt et utilisations (le rôle des métabolites dans la plante).....	13
II.2 Métabolites secondaire du <i>Datura</i>	13
II.3 Contenus alcaloïdiques du <i>Datura</i>	14
II.3.1 Alcaloïdes de <i>Datura</i>	14
II.3.1.1 L'atropine (D, L-hyoscyamine)	14
II.3.1.1.1 Pharmacocinétique	15
II.3.1.1.2 Mécanisme d'action.....	15
II.3.1.1.3 Doses toxiques de l'atropine	16
II.3.1.2 L'hyoscyamine	16
II.3.1.3 La scopolamine	16
II.3.1.3.1 Pharmacocinétique	17
II.3.1.3.2 Mécanisme d'action	17
II.3.1.3.3 Dose toxique de la scopolamine	17
II.3.2 Distribution des alcaloïdes dans la plante	17
II.4 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques	18

II.5	Activité biologique des alcaloïdes du <i>Datura stramonium</i>	19
II.5.1	Effets pharmacologiques	19
II.5.2	Effets d'intoxication	20
II.6	Extraction et dosage des alcaloïdes	21
II.6.1	Extraction des alcaloïdes de <i>Datura stramonium</i>	21
II.6.1.1	Extraction par solvants organiques	21
II.6.1.2	Extraction par un solvant en milieu alcalin	21
II.6.1.3	Extraction par un solvant en milieu acide	22
II.6.1.4	Macération	22
II.6.2	Dosage des alcaloïdes.....	22
III.	La maladie du chevelu racinaire	23
III.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	23
III.2	Plasmide Ri.....	23
III.3	Mécanismes de la transformation par l' <i>Agrobacterium</i>	24
III.4	Intérêts de la culture des chevelus racinaires.....	25
III.5	facteurs influençant l'induction de chevelus racinaires par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	26
IV.	La production des alcaloïdes à partir de chevelus racinaires	28
IV.1	Optimisation des conditions de croissance et du milieu.....	28
IV.2	L'élicitation	29
IV.3	L'utilisation de précurseurs	31
IV.4	L'immobilisation des cellules.....	32
IV.5	La perméabilisation des cellules (des chevelus racinaires)	32

DEUXIEME PARTIE : Matériels et méthodes

I.	Objectif du travail	43
II.	Obtention des vitro-semis	43
II.1	Origine des graines de <i>Datura stramonium</i>	43
II.2	Scarification des graines.....	43
II.3	Désinfection des graines	43
II.4	Mise en culture	35
III.	Obtention des chevelus racinaires	37
III.1	Origine de l'agrobactérie	37
III.2	Préparation de la suspension bactérienne	37
III.3	Isolement des racines transformées.....	40
III.4	Multiplication des lignées racinaires obtenues	40
III.5	Sélection des lignées racinaires performantes.....	41
III.6.	Détermination de la cinétique de la croissance des chevelus racinaires	42

TROISIEME PARTIE : Résultats et interprétations

I. Germination des graines de <i>Datura</i>	43
II. Obtention des chevelus racinaires	43
II.1 Taux de réactivité	43
II.2 Taux d'induction racinaire	43
II.3 Temps moyens d'apparition de la première racine	44
II.4 Nombre moyen de racines par explant.....	44
III. Sélection des lignées racinaires	44
IV. Evolution de la biomasse des chevelus racinaires (cinétique de croissance)	45
Conclusion générale	47
Référence bibliographique	48

Introduction

Les plantes sont des usines biologiques naturelles. Elles produisent des substances actives biochimiques : alcaloïdes, huiles essentielles, flavones, tanins,... et les mettent à la disposition de l'homme qui peut en faire usage pour sa santé et satisfaire ses besoins vitaux (**Schauenberg et Paris, 1997**).

Parmi les plantes médicinales utilisé par l'homme le *Datura stramonium* ; est une espèce de plantes dicotylédones de la famille des Solanaceae, riche en alcaloïdes tropaniques, méritant d'être valorisée pour la production de l'H&S (**Houmani et al., 1994**).

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**).

Ces métabolites secondaires sont généralement produits en faible quantité par les plantes (**Namdeo, 2007**). Par conséquent, il est difficile de les obtenir en grande quantité par culture en serre ou en plein champ. En effet, pour de nombreuses raisons, il devient souhaitable d'utiliser les techniques de culture *in vitro*.

Les métabolites secondaires produits sont d'un grand intérêt dans l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire (**Sasson, 1991**). Parmi ces métabolites, les alcaloïdes tropaniques, dont la scopolamine et l'hyoscyamine, sont déjà utilisés en pharmacologie humaine et vétérinaire (**Shimomura et al., 1991**). Ils sont extraits à partir de Solanaceae dites mydriatiques tel que le *Datura stramonium* L. qui en est particulièrement riche (**Houmani, 1999**).

La biosynthèse des métabolites secondaires est liée à la différenciation cellulaire. En effet, Les alcaloïdes nécessitent des tissus racinaires constitués de cellules spécialisées pour que la biosynthèse soit effective (**Guignard et al., 1985**). C'est donc une condition obligatoire pour envisager toute production *in vitro* (**Zrýd, 1988**). Le chevelu racinaire (CR) obtenu par transformation génétique à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* s'avère un matériel végétal de choix. Ce type de tissus présente une croissance rapide et peut produire des taux significatifs de métabolites secondaires comparativement aux autres types de matériel végétal mis en culture (suspensions cellulaires, cals, tissus ou d'organes ...etc) (**Bourgaud et al., 1997, Amdoun et al., 2007**).

C'est dans ce contexte que se situe notre travail dont l'objectif est d'étudier l'induction des chevelus racinaires chez *Datura stramonium* afin d'optimiser sa production alcaloïdique

Première partie: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



Figure 1 : *Datura stramonium* (Gaire, 2008)

I. Généralités sur *Datura stramonium*

I.1 Présentation de *Datura stramonium*

Datura stramonium (figure 1) est une plante annuelle principalement autogame (Weaver *et al.*, 1985), c'est une espèce cosmopolite que l'on rencontre dans de nombreuses régions du globe (Mairura et Setshog, 2008) ; c'est une plante diploïde ($2n=2\times=2n$) de la famille de la solanacée (Schmelzer *et al.*, 2008), grosse et grossière, ramifiée librement d'une hauteur pouvant atteindre un mètre à deux dans un sol riche (Molino, 2005), connue depuis l'antiquité et utilisée pour ces propriétés pharmacologiques mais aussi pour ces propriétés toxiques surtout hallucinogènes, appelée chedjret el djina ou djahanam en Algérie (Trabut, 1935).

❖ *Etymologie:*

Datura vient du nom arabe de la plante : Tatôrah ou Datora venant lui même de Tat qui signifie piquer, à cause du fruit épineux. L'étymologie de stramonium est douteuse. Il y a plusieurs hypothèses : de Strymonio une région de Thrace en Grèce où elle est connue depuis l'Antiquité, ou de stremma monia = « gâteau insensible » pour ses propriétés stupéfiantes, ou encore de Strychnos manikos qui signifie « morelle qui rend furieux » pour son action enivrante (Martel, 2014).

Le *datura stramonium* est connu sous de nombreux noms :

Arabe: datura , nafir , taturah

Berbère : tabourzigt , tidilla.

Anglais : thornapple, jimson weed .

Français : *Datura*, stramoine (Molino, 2005).

❖ *Nomenclature*

Datura stramonium L

❖ *Synonymes*

D. inermis Juss. ex Jacq.

D. chalybea W. D. J. Koch

D. tatula (L.) Torr (Gaire, 2008).

❖ *Noms communs (Vernaculaires)*

✓ **Algérie:** sikrane (Bouzidi *et al.*, 2011).

✓ **Tunisie:** sak el ghoul (Bouziri *et al.*, 2011).

✓ **Maroc:** chdeq ej-jmel (El Bazaoui *et al.*, 2009)

✓ **Iran:** tatoore (Amini *et al.*, 2012).

✓ **Etats-Unis:** jimson weed, locoweed, Jamestown weed, angel's trumpet (Mountain, 1987; Perrotta *et al.*, 1995; Salen *et al.*, 2003; Allerberger *et al.*, 2007).

✓ **France:** pomme épineuse, stramoine, herbe à sorcier, herbe du diable, herbe à la taupe, herbe des démoniaques, pomme du poison, trompette de la mort, pomme folle (Roblot *et al.*, 1995; Arouko, 2003; Bock, 2012).

✓ **Allemagne:** stechapfel, dornapfel, hexenkraut, igelnuss, teufelsapfel (**Bonnier, 1990**).

✓ **Italie:** stramonio, noce-spinosa, noce-puzza (**Bonnier, 1990**).

❖ **Variétés :**

✓ *Datura stramonium* var. *inermis*, fruit inerme, Corse, Essonne

✓ *Datura stramonium* var. *stramonium*

✓ *Datura stramonium* var. *tatula* (L.) tiges violettes, fleur blanche ou lilas, à cœur pourpre profond (**Rakotoarivelo, 2011**).

I.2 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

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

I.3 Origine et répartition

Datura, aussi appelée pomme d'épine, est une herbe annuelle de jardins, de bords de route et d'autres lieux de déchets ou de terre cultivées, Il est largement naturalisé dans plus chaud pays à travers le monde (**Nayyar et al., 2020**) . Le nom générique, *Datura*, vient du Hindoo Dhatura, dérivé du Sanskrit, Dhustura (**Gaire, 2008**).

Il est douteux à quel pays cette plante appartenait à l'origine. Selon certains auteurs l'origine de *Datura* a été pensée pour être de la Chine, mais les dernières études révèlent qu'il est originaire de l'Inde (**Gaire, 2008**).

D'autres auteurs, en se référant aux derniers travaux sur la taxonomie des *Datura*, s'accordent à dire que toutes les espèces de *Datura* sont originaires du Mexique (considéré comme le centre de la diversité des *Datura* dans le monde) et rejettent catégoriquement la possibilité de leur présence dans l'ancien monde à l'époque précolombienne (**Symon et Haegi, 1991 ; Mace et al., 1999**) (figure 2)

Le genre *Datura* regroupe neuf espèces en général, dont cinq sont identifiées à l'état spontané en Algérie par **Houmani-Benhizia, (1999)**, il s'agit de *Datura ferox* L, *Datura inoxia* Mill, *Datura quercifolia* Humb, *Datura stramonium* L et *Datura tatula* L. le *Datura stramonium*, Considérée comme la plus fréquente et la plus décrite (**Bruneton, 2005**). Il est originaire des Amériques et à été introduit dans nombreuses région tropicales, subtropicales et même tempérées C'est une plante adventice

naturalisée dans de nombreux pays Africains, mais les données sur sa présence sont certainement très lacunaires (Mairura et Setshogo, 2008).

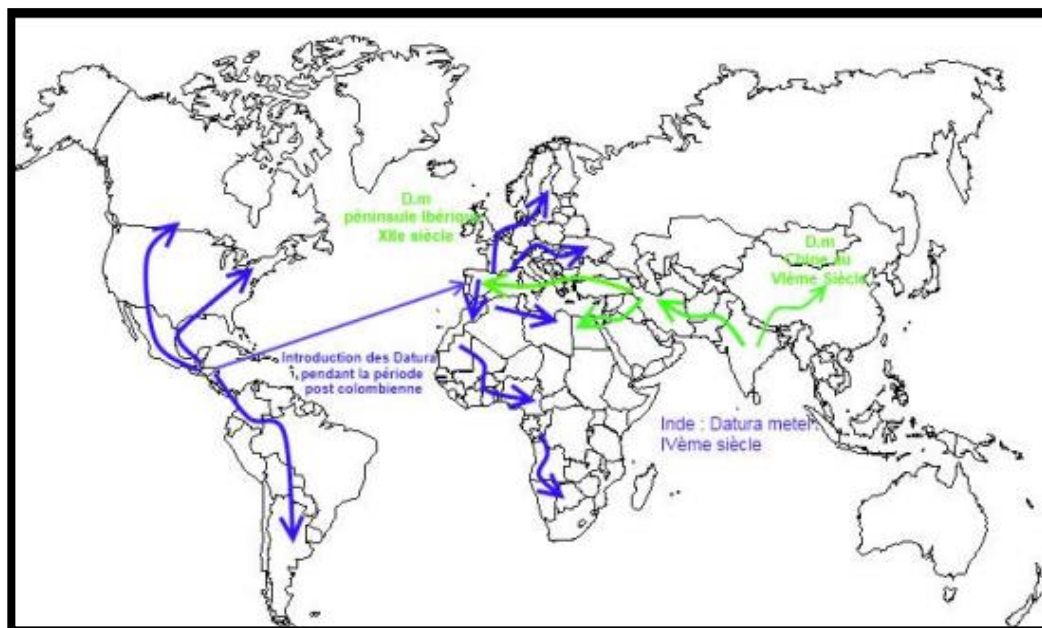


Figure 2: Voies hypothétiques d'expansion des *Datura* sp dans le monde *Datura* sp (Bleu) et *Datura metel* (vert) (Mosrli, 2013).

I.4 Caractéristiques de la plante

A. Appareil végétatif

Datura stramonium (figure. 2) est une plante annuelle herbacée, pousse librement jusqu'à plus de un mètre de haut, dans les sols riches, généralement glabre, avec une odeur désagréable au froissement. (Geeta et Gharaibeh, 2007 ; Boris, 2001 ; Aliasgharpour *et al.*, 2000., Mirzamatov *et al.*, 1972).

Les feuilles alternes mesurent jusqu'à 8 cm de long et 6 cm de diamètre (à l'exclusion des pétioles). Elles sont ovales ou ovales-cordées, mais pennées. Ces lobes sont peu profonds et pointus à leur extrémité; il y a habituellement 2-3 de ces lobes de chaque côté du limbe des feuilles. La marge de chaque feuille peut avoir quelques lobes secondaires ou des dents dentées grossières; sinon elle est lisse ou légèrement ondulée. Les feuilles peuvent être légèrement pubescentes lorsqu'elles sont jeunes, mais deviennent glabres avec l'âge; la surface supérieure de chaque feuille est souvent vert foncé et terne. Le feuillage de *Datura* dégage une amère odeur. Les feuilles sont caulinaires et ramales, exstipulées; alternes à opposées, pétiolées, simples, disséquées, aiguës, glabres, uncostées, réticulaires. Les feuilles sont grandes et angulaires, inégales à la base, avec une marge ondulée et grossièrement dentée, et ont les nervures fortes et ramifiées très clairement développées. La surface supérieure est sombre vert grisâtre, généralement lisse, la surface inférieure plus pâle, et lorsqu'elle est sèche, minutieusement ridée (Gaire, 2008).

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).

La racine est forte, rameuse, fibreuse et blanchâtre (**Cazin et Cazin, 1997**), partie souterraine contient une racine principale, d'une couleur blanchâtre, distribuant plusieurs fibres très long et épais (**Mountain, 1987; Bonnier, 1990**).

B. Appareil reproducteur

Les fleurs sont très grande «6-10 cm», solitaire à l'aisselle des feuilles ou par deux, à calice tubuleux «4-6 cm», vert très pâle ou violacé, à 5 sépales plissés anguleuses, à corolle blanche, évasée en entonnoir «6-12 cm», terminé par 5 lobes (**Beauquesne et al., 1980; Bonnier, 1990; Bock, 2012**).

Chaque fleur est remplacée par un fruit dur qui est sec et épineux; il est d'environ 1½ "de long, 1" de diamètre et de forme sphéroïde-ovoïde. Sous chaque fruit se trouve un reste tronqué du calice qui s'incurve brusquement vers le bas. Ces fruits sont initialement verts, mais deviennent bruns avec la maturité (**Gaire, 2008**).

Les graines sont réniformes, aplaties sur une face, de 4-5 mm 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 huileux, puis âcre et nauséux (**Paris et Moyses, 1971**).

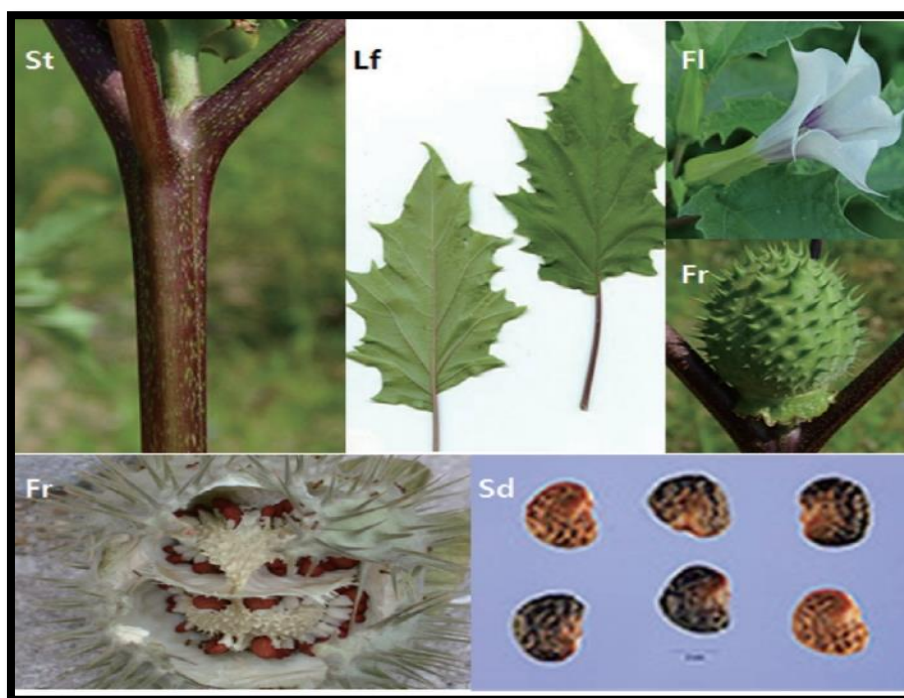


Figure 3: Différents parties de *Datura stramonium* (**Gaire, 2013**).

St : stem (Tige) ; **Lf :** leaf (Feuilles) ; **Fl:** flower (Fleures) ; **Fr :** Fruit (Fruite) ;
Sd : seed (Grains)

I.5 Aspect génétique de *Datura stramonium*

Le *D. stramonium* est une plante diploïde (2n) de 24 chromosomes dans les cellules somatiques. dans des articles précédents, la découverte de tétraploïdes(4n) avec 48 chromosomes et de triploïdes (3n) avec 36 chromosomes a été rapportée, ainsi que de mutants déséquilibrés avec 25 chromosomes représentés par la formule (2n+1) . la découverte de deux haploïdes ou dans des plantes, que nous sommes en mesure de signaler, ajoute un nouveau type chromosomique à la série équilibrée: 1N,2n,3n, 4n (**Blakeslee et al., 1922**).

Les Races tétraploïdes de *D. stramonium* se distinguent des diploïdes par le plus sphérique forme et plus petite taille de la capsules Matures, graines plus grosses, moins mais feuilles plus grandes et fleurs plus grandes (**Avery , 1959**). Les plantes haploïdes, d'autre part, sont un peu plus faibles que les diploïdes normaux, et ont des feuilles plus étroites. Les tiges minces et des fleurs plus petites (**Avery , 1959**).

I.6 Intérêt et utilisations de *Datura stramonium*

I.6.1 Intérêt de *Datura stramonium*

Il a été utilisé par les Indiens rouges pour de nombreuses années comme agent euphorique et depuis le 1800, utilisé comme agent thérapeutique et dans Grande-Bretagne (**Dessanges, 2001**). Les *Datura* présentent de nombreuses applications dans le domaine de la dépollution des eaux et des sols. En effet, il est à noter leur utilisation pour l'absorption des déchets radioactifs, comme au niveau du laboratoire californien de Los Alamos, où ces plantes servent pour purifier l'eau chargée en métaux radioactifs ou toxiques (**Rolard, 2002**).

En Agriculture, les *Datura* peuvent être employées en lutte biologique, méthode alternative grâce à leur activité biopesticide, contre plusieurs ravageurs tels que les insectes (aleurodes), les acariens, et les nématodes phytoparasites ainsi que contre des pathogènes (**Beliard et al, 2002 ; Rolard, 2002**).

I.6.2 Utilisation médicinale et traditionnel

Les *Datura* sont connus pour leurs propriétés médicinales intéressantes depuis fort longtemps. Les graines de *Datura* sont écrasées avec grains de riz et prises par voie orale pour soulager l'indigestion (**Gaire , 2013**). Les extraits de *D stramonium* sont utilisés depuis des siècles dans les préparations homéopathiques pour asthme, psychose, épilepsie, dépression, brûlures, blessures et maladie de Parkinson. Certains les chercheurs ont démontré son activité antimicrobienne in vitro. De plus, La plante semble obtenir une palliation au moyen d'un effet "narcotique" que sa résine produit. Les gens de diverses cultures ont traité les maux de dents en inhalant de la vapeur à partir de graines bouillies ou feuilles, mâcher la racine, fumer les feuilles et l'utilisation non précisée des fleurs (**Brooks et al., 2007**). La plante est utilisée pour traiter la diarrhée, les crampes intestinales et la nycturie (**Chan, 2002**), l'hypertension et la maladie cardiaque (**Eddouks et al., 2002**). Cette plante est fréquemment utilisée comme un traitement

anti asthmatique; en fumigation du feuilles roulées en cigarette ou hachées et mêlées à du tabac (Spichiger *et al.*, 2002; Pretorius et Marx, 2006).

L'extrait méthanoïque de la partie aérienne de *Datura stramonium* possède une activité antibactérienne (Eftekhar *et al.*, 2005), quant à l'extrait aqueux des graines, il est utilisé dans le traitement des douleurs gastrique (Gidado *et al.*, 2007). Les fleurs sont séchées et fumées ou fumigées dans le traitement de l'asthme. De façon générale, toutes les parties de la plante sont utilisées dans la médecine traditionnelle, afin de provoquer une sédation ou faire disparaître la fatigue (El Bazaoui *et al.*, 2009). Le jus de fleur est utile pour les maux d'oreilles (Govil *et al.*, 2002), utilisé aussi comme anesthésiant dans les cas de carie dentaire (Bremness, 2005). Le cataplasme fait à partir des fleurs est appliqué aux blessures pour réduire la douleur. Une décoction de la fleur et la racine ont été utilisées comme sédatif pour calmer les patients lors de l'établissement des fractures (Bhattacharjee, 2004). Les fleurs sont L'huile de graine de *Datura* est utilisée dans plusieurs formulations faites pour arrêter/repousser les poils et pour surmonter les pellicules ; L'huile de graines de *Datura* est extraite à l'aide d'une presse à froid et d'une extraction au solvant. L'huile *Datura* a plusieurs applications industrielles (Nayyar *et al.*, 2020).

Les indiens algonquins en utilisaient les racines dans la confection d'un breuvage qu'ils administraient aux jeunes hommes afin qu'ils perdent la mémoire de leur enfance (Arouko, 2003). Les graines sont souvent utilisées comme aphrodisiaque (Gaire, 2005; El Bazaoui *et al.*, 2009). Les feuilles de *Datura* sont pilés avec l'eau et appliqués pour traiter les maux de tête ; les graines sont mélangées à de l'huile de palme et appliquées à des cas graves de piqûres d'insectes (Gaire, 2013).

En Inde, une préparation faite de jus de feuilles de *Datura*, de nim (*Azadirachta indica*) et de bétel (*Piper bettle*) est appliquée sur l'eczéma. Le jus des feuilles est aussi donné comme anthelminthique et antipyrétique (Khare, 2003).

Les Mayas soignaient les ulcères et les hémorroïdes par l'application directe d'une préparation à base d'huile obtenue à partir des feuilles de *Datura stramonium* et les hypothermies par le frottement de feuilles de *Datura stramonium* au niveau des zones concernées (Marc, 2000).

En Amérique du Sud, des décoctions de graines sont utilisés comme agent incapacitant pour les viols et les vols (Gaillard et Pepin, 1999).

Les médecins grecs et romains ont utilisé *Datura* mélangé à de l'opium comme sédatif et général anesthésique pendant la chirurgie. En fait, l'utilisation de la scopolamine (l'un des alcaloïdes de *Datura*) plus la morphine comme analgésique efficace et inducteur de sommeil était une pratique courante jusqu'à Le dix-neuvième siècle. En 1905, le Dr Carl Gauss a utilisé des extraits de *Datura* et de morphine pour induire un sommeil crépusculaire traitement pour les femmes ayant des accouchements difficiles. La combinaison de la scopolamine (l'un des alcaloïdes actifs trouvés dans *Datura*) plus la morphine a été utilisée pendant des années comme analgésique et inducteur de sommeil efficaces (Gaire, 2008).

Autre utilisations médicinales de la plante sont: propriété anti-inflammatoire de toutes les parties de la plante, antioxydant, anti-rhumatoïde et hypoglycémique. Elle est aussi utilisée pour les brûlures, les ulcères, les infections des sinus, les maux de tête et les plaies (**Devi et al., 2011**), contre les névralgies et l'épilepsie (**Bonnier, 1990**), pour la stimulation du système nerveux central (SNC), la décongestion des voies respiratoires, le traitement de mal de dents et l'alopecie (**Gidado et al., 2007**), comme anesthésique et pour calmer les spasmes musculaire (**Zhi-Yan et al., 1994**).

I.6.3 Utilisation agricole

La culture de cette plante fonctionne comme un insectifuge, qui protège les plantes contre les insectes voisins (**Sanjita et al., 2012**). La plante est utilisée comme antifongique contre plusieurs types de champignons, comme nématocide (**Marc, 2000**) et comme antiparasites de moutons et de poulets (**Viegi et al., 2003**).

Elle est utile dans la lutte contre les doryphores pour le maraichage, attire les doryphores qui y pondent, les œufs éclosent et les jeunes larves s'empoisonnent en se nourrissant de la plante (**Site Gerbeaud**).

Aussi utilisée dans la lutte biologique contre les maladies bactériennes et fongiques des plantes cultivées. De plus leur sensibilité aux virus, tel que les Verus A, X et Y de la pomme de terre les rend bien appréciées comme plantes indicatrice (**Van Der Plank et O'Connor, 1959**). Le *D. stramonium* figure parmi les plantes qui peuvent diminuer les populations de nématodes à galle de la tomate, et même pour lutter contre le doryphore de la pomme de terre (**Li et al., 2006**).

L'allélopathie de *Datura* pourrait être utiliser pour lutter contre les mauvaises herbes de blé tendre (*Triticum aestivum L.*) (**Javaid et al., 2008**). Les *Datura* possèdent en outre une activité allélopathique contre les plantes compétitives. Des essais in vitro montrent que les alcaloïdes issue des graines de *D. Stramonium* (hyosvyamine et scopolamine) inhibent la croissance des semi de tournesol *Helianthus annus L.* (**Levitt et Lovett, 1984**), ainsi que la germination et l'élongation radiculaire de *Linum usitatissimum L.* (**Lovett et al., 2006**). Les extraits aqueux de *Datura* inhibent la germination et la longueur radiculaire du maïs (**scepanovic et al., 2008**).

I.6.4 Utilisation écologique

D'après **Wao et al., (2014)**; les *Datura* peuvent être aussi utilisés dans le domaine écologique, dans la bioremédiation des sols et des eaux polluées par les métaux lourds. Ainsi, ces derniers seront concentrés sur les parois cellulaires de la plante. Elles présentent de nombreuses applications dans le domaine de la dépollution des eaux et des sols. En effet, il est à noter leur utilisation pour l'absorption des déchets radioactifs, comme au niveau du laboratoire californien de Los Alamos, où ces plantes servent pour purifier l'eau chargée en métaux radioactifs ou toxiques) (**Rolard, 2002**).

I.7 Contenus alcaloïdiques de la plante

I.7.1 C'est quoi un alcaloïde

Les alcaloïdes sont des substances organiques le plus souvent d'origine végétale, azotées, basiques et douées à faible dose de propriétés physiologiques marquées (**Zenk et Juenger, 2007**). Ils portent tous la terminaison « ine » (**Paris et Hurabielle, 1981**). A l'état normal, ils sont généralement salifiés par les acides organiques (tartrates, malates...) ou combinés à des tanins (**Guignard et al., 1985**). On les classe sous trois groupes:

Les alcaloïdes vrais: l'azote inclus dans un hétérocycle, ce groupe reprisent la majorité des alcaloïdes.

Les proto-alcaloïdes: ils ne possèdent pas un azote intra-cyclique, ils ont une structure proche des amines (**Guignard, 2000**).

Les pseudo-alcaloïdes: ils présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (**Bruneton, 1999**).

Le site de la synthèse des alcaloïdes est la racine; cela a été établi par l'étude de l'accumulation d'alcaloïdes dans les greffes réciproques de *Datura* avec du tabac et de la tomate. Scions de tabac et la tomate greffés sur les stocks *Datura* contiennent des alcaloïdes de *stramonium* tandis que Les greffons de datura greffés sur des porte-greffes de tabac et de tomate ne contiennent pas d'alcaloïdes. Les alcaloïdes dans les feuilles sont principalement situés dans l'épiderme, en particulier dans la partie supérieure d'épiderme et dans le parenchyme du phloème; la nervure médiane contient les concentrations les plus élevées d'alcaloïdes que le pétiole. Les feuilles supérieures et les branches sont plus riches en alcaloïdes que ceux près de la base (**Anonymes, 2003**).

I.7.2 Teneur en alcaloïdes totaux fonction des organes

D'après **Martel (2012)**, la teneur en alcaloïdes est sensiblement la suivante dans les organes secs :

- Feuilles : 0,2 à 0,5%
- Racine : 0,06 à 0,3 %
- Tige : 0,1 à 0,24 %
- Fleur : calice 0,3 % - corolle 0,4 % - pistil 0,3 %
- Fruit : péricarpe 0,08 % - placenta mûr 0,3 %
- Graine 0,2 à 0,3 %
- Plantule : 0,1 à 0,7 %

I.7.3 Diversité des alcaloïdes chez *Datura stramonium*

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). Berkove *et al.*, (2005), ont analysé le profil alcaloïdique des parties de la plante de *Datura stramonium* recueillies à différents stades de développement par GC-MS, et ont détecté 64 alcaloïdes tropaniques, et ont identifiés 48 d'entre eux.

Deux nouveaux alcaloïdes ont été identifiés il s'agit du 3-phénylacétoxy-6,7-epoxynortropane et du 7-hydroxyapoatropine. D'autres composés sont signalés pour la première fois pour *D. stramonium*, il s'agit de la scopoline, du 3- (hydroxyacetoxy) tropane, du 3-hydroxy-6-(2-méthylbutyryloxy) tropane, du 3- α -tigloyloxy-6- hydroxytropane, du 3,7-dihydroxy-6-tigloyloxytropane, du 3-tigloyloxy-6 - propionyloxytropane, du 3-phénylacétoxy-6, 7-epoxytropane, du 3-phénylacétoxy-6-hydroxytropane, de l'apocopolamine, du 6- α -7-ditigloyloxytropane ,de l'hydroxyhyoscyamine et du 3-acétoxy-6-isobutyryloxytropane pour la première fois pour la famille des Solanacées .

Tableau 1 : Liste des alcaloïdes trouvés dans *Datura stramonium* (El Bazaoui *et al.*, 2011)

Les Alcaloïdes	
• Hygrine	
• 6,7-Dehydrotropine	
• Cyclotropine	
• Tropinone	
• Tropine	
• Pseudotropine	
• Scopoline	
• Scopine	
• 3-Acetoxytropane	
• 3,6-Dihydroxytropane	
• Methylecgonine	
• 3-(Hydroxyacetoxy)tropane	
• 3-Acetoxy-6-hydroxytropane	
• 3-Hydroxy-6-acetoxytropane	
• 3-Methylbutyryloxytropane	
• 3,7-Dihydroxy-6-propionyloxytropane a	
• 6,7-Dehydro-3-tigloyloxytropane a	
• 3,6-Diacetoxytropane	
• 3 α -Tigloyloxytropane	
• 3-Hydroxy-6-isobutyryloxytropane	
• 3 β -Tigloyloxytropane	
• 3-Isovaleroyloxy-6-hydroxytropane	ou 3-(2'-methylbutyryloxy)-6-hydroxytropane)
• 3-Hydroxy-6-(2'-methylbutyryloxy)tropane	
• 3-Hydroxy-6-methylbutyryloxytropane	
• 3-Tigloyloxy-6,7-epoxytropane a	
• 3-Tigloyloxy-6-hydroxytropane	
• 3 α -Hydroxy-6 β -tigloyloxytropane	
• 3 β -Hydroxy-6 β -tigloyloxytropane	
• 3-Tigloyloxy-6-acetoxytropane	
• 3,7-Dihydroxy-6-(2'-methylbutyryloxy)tropane a	
• 3-Tigloyloxy-6-propionyloxy-7-hydroxytropane	
• 3-Phenylacetoxytropane	
• 3-(2'-Phenylpropionyloxy)tropane	
• 3-Tigloyloxy-6-propionyloxytropane	
• 6,7-Dehydro-3-apotropyloxytropane a	

- 3-Tigloyloxy-6-isobutyryloxytropne
- 3-Tigloyloxy-6,7-dihydroxytropane
- Apatropine
- 3,7-Dihydroxy-6-tigloyloxytropane
- 3-Phenylacetoxy-6,7-epoxytropane
- Dihydroaposcopamineb

- 3-Tigloyloxy-6-(2'-methylbutyryloxy)tropane
- 3-Tigloyloxy-6-methylbutyryloxytropane
- 6,7-Dehydrohyoscyamine b
- 3-(3'-Methoxytropoyloxy)tropane a
- 3-Phenylacetoxy-6-hydroxytropane
- Aponorscopamine
- Aposcopamine
- 3-Tigloyloxy-6-isobutyryloxy-7-hydroxytropane a
- Littorine
- Hyoscyamine (Atropine)
- 3,6-Ditigloyloxytropane
- 6-Hydroxyapatropine
- 3 α -Tigloyloxy-6-isovaleroyloxy-7-hydroxytropane
- 3 β -Tigloyloxy-6-isovaleroyloxy-7-hydroxytropane
- Methylscopolamine
- 3-(3'-Acetoxytropoyloxy)tropane
- Scopolamine
- 4'-Hydroxylittorine b
- 3,6-Ditigloyloxy-7-hydroxytropane
- 7-Hydroxyhyoscyamine
- 6-Hydroxyhyoscyamine
- 3-Tropoyloxy-6-acetoxytropane
- 3-Tropoyloxy-6-isobutyryloxytropane a
- 3 α -Tropoyloxy-6 β -isovaleroyloxytropane
- 3 β -Tropoyloxy-6 β -isovaleroyloxytropane a
- 3-Tropoyloxy-6-tigloyloxytropane

II. Métabolites secondaires

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

La croissance et le développement des végétaux sont associés à la production de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites primaires sont directement impliqués dans les processus de développement, de fonctionnement de base et de la reproduction des cellules. Chimiquement. Les métabolites secondaires(MII) (Un métabolite secondaire est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire (**Rakotoarivelo, 2011**), ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Ils ne participent pas directement aux processus vitaux des cellules, mais assurent néanmoins des fonctions écologiques importantes, souvent en lien avec leur localisation dans la plante (**jaber, 2017**). Ils jouent différents rôles : phéromones, signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à un changement de l'environnement, moyens de défense contre les herbivores, pathogènes (phytoalexines) ou compétiteurs. D'autres MII protègent la plante des radiations solaires. 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 (**jaber, 2017**).

II.2 Métabolites secondaire du *Datura*

La plante est riche en une variété de métabolites secondaire tels que les tanins, les terpénoïdes, alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, stéroïdes, glycosides et huiles volatiles, Les alcaloïdes sont une des classes des métabolites secondaires les plus importants. La concentration d'alcaloïdes dans la plante varie avec l'âge et le stade de développement, les tissus et l'emplacement géographique.

Les alcaloïdes tropaniques sont produits dans le tissu racinaire dès 18 jours après la germination et sont ensuite transloqués au tournage. Les trois principaux : la L-hyoscyamine, l'atropine (mélange racémique de D- et L-hyoscyamine), et la scopolamine inhibent les récepteurs de l'acétylcholine et entraînent des propriétés pharmacologiques mises à profit en médecine. Le *Datura officinal* (stramoine) est d'ailleurs inscrit à la pharmacopée avec des taux minima d'alcaloïdes tropaniques de 0,2 à 0,5 % de matière sèche (**Chollet et al .,2010**).

(**Paris, Horse et Garnier**) décrivent la composition du *Datura*.

La feuille sèche contient :

- 8 % d'eau
- 15 à 18 % de matières minérales
- des traces de scopolétole (une coumarine)
- des pigments flavoniques comme l'anthocyanoside qui donne la coloration

- violette des nervures chez la variété tatula. des bases volatiles des alcaloïdes tropaniques : hyoscyamine et scopolamine, dont la teneur en alcaloïdes totaux est comprise entre 0,2 et 0,5 %. Les proportions hyoscyamine /scopolamine sont très variables : généralement voisines de 2/3- 1/3 à 3/4-1/4.

Les graines renferment :

- 8 à 9 % d'eau
- 3% de cendres riches en phosphore
- 15 à 30 % d'huile, l'acide daturique qui serait un mélange d'acide palmitique et stéarique
- 0,2 à 0,3 % d'alcaloïdes totaux avec une proportion de scopolamine moins élevée que dans la feuille.

II.3 Contenus alcaloïdiques du *Datura*

Les alcaloïdes sont classés en fonction de leurs activités biologiques ou en fonction de leur structure chimique en plusieurs groupes, parmi ceux-ci on trouve les alcaloïdes tropaniques (**Brunton, 1999**). Ils possèdent une grande diversité dans leur origine botanique et biochimique, leur structure chimique et leur action pharmacologique (**Martel, 2012**).

La classification phytochimique des alcaloïdes est basée sur l'origine de l'acide aminé utilisé pour fabriquer cet alcaloïde (**Martel, 2012**) Les acides aminés en C4 et en C5, ornithine et lysine, sont à l'origine de nombreux alcaloïdes dont la structure peut-être plus ou moins complexe. La complexité dans ce groupe se traduit par la formation, à partir de plusieurs molécules de l'acide aminé, d'édifices polycycliques : pyrrolizidines, indolizidines, quinolizidines (bi-, tri-, tétra-, pentacycliques).

II.3.1 Alcaloïdes de *Datura*

Les alcaloïdes de *Datura* font partie du groupe des alcaloïdes tropaniques (alcaloïdes hétérocycliques). On connaît environs 150 alcaloïdes dans ce groupe répartis dans un petit nombre de familles d'Angiospermes dont les Solanacées. Ils sont présents dans une vingtaine de genre de cette famille. Dans l'espèce *Datura stramonium*, soixante-quatre alcaloïdes tropaniques ont été détecté. Pour se donner une idée de la diversité des alcaloïdes de *Datura stramonium* (**Maibam et al., 2011**). Les trois principaux alcaloïdes de *Datura stramonium* sont : L'atropine , la scopolamine et L-hyoscyamine.

II.3.1.1 L'atropine (D, L-hyoscyamine) :

L'atropine est l'ester du tropanol et de l'acide tropique, c'est un mélange 20 racémique de D et L- hyoscyamine (figure. 4) (**Vakili et al., 2012**) , leur formule chimique est ; $C_{17} H_{23} NO_3$. Est une poudre blanche. 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**).

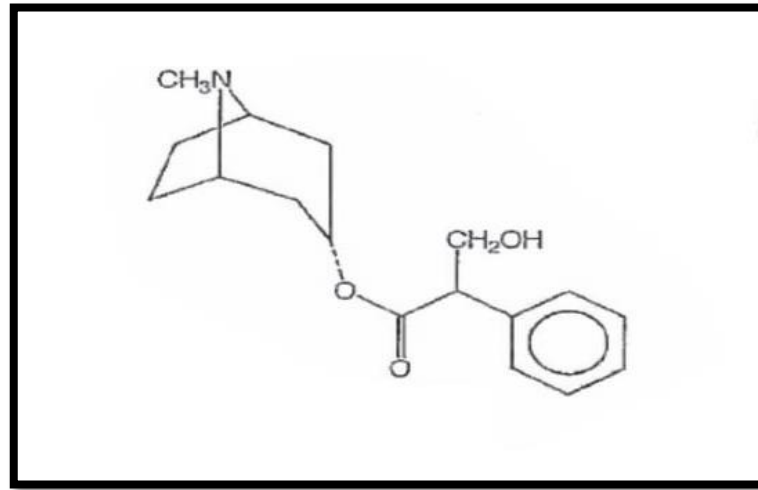


Figure 4: structure chimique de l’atropine (Pujol *et al.*, 2006).

II.3.1.1.1 Pharmacocinétique

L’atropine est rapidement absorbée par les muqueuses gastro-intestinale et respiratoire (Rodrigo et Rodrigo, 2002; Pretorius et Marx, 2006). Sa diffusion se fait dans tout l’organisme, y compris le système nerveux central, à travers le placenta et dans le lait (Moulin, 1998). Elle est métabolisée dans le foie (Ertekin *et al.*, 2005), environ 60 % de la dose sont excrétés sous forme inchangée dans l’urine et la partie restante apparaît dans l’urine sous forme de métabolites hydrolysés et conjugués (Katzung, 1996). Le tableau 2 montre quelques paramètres pharmacocinétiques des alcaloïdes de *Datura stramonium*.

Tableau 2: Principales paramètres pharmacocinétiques des alcaloïdes de *Datura stramonium* chez l’homme (Goullé *et al.*, 2000).

	Atropine (DL-hyoscyamine)	Scopolamine (L-hyoscine)	Hyoscyamine
Demi-vie (heure)	2-5	3-8	3-8
Volume de distribution (l/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	-	-

II.3.1.1.2 Mécanisme d’action :

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 parasympatholytiques (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 parasympathiques, 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**).

II.3.1.1.3 Doses toxiques de l'atropine

En fonction de la dose considérée, les symptômes d'intoxication se manifestent par des effets parasympatholytiques périphériques et centraux (**Reichl et al., 2004**). La dose létale approximative pour un homme adulte est de 10 mg d'atropine (**Clark, 2005; Allerberger et al., 2007**).

II.3.1.2 L'hyoscyamine

Le -hyoscyamine est l'ester de tropanol et de l'acide L-tropique (**Gryniewicz et Gadzikowska, 2008**). Elle est l'isomère lévogyre de l'atropine racémique (**Peter, 1983**) (Figure 6). Elle se transforme facilement en son isomère inactif l'atropine, quand on la chauffe (**Fabre et Truhaut, 1961**) ou durant les procédures d'extraction (**Schorderet et al., 1998; Iranbakhsh, 2006; Caligiani et al., 2011**). L'hyoscyamine est deux fois plus active que l'atropine (**Grevoz et Laubriet, 2007**), mais cette dernière est la forme acceptée en médecine parce qu'elle est stable et moins sensible aux enzymes hydrolytiques (**Gryniewicz et Gadzikowska, 2008**).

L'hyoscyamine (figure 5) est un mydriatique énergétique. Ses effets physiologiques sont 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

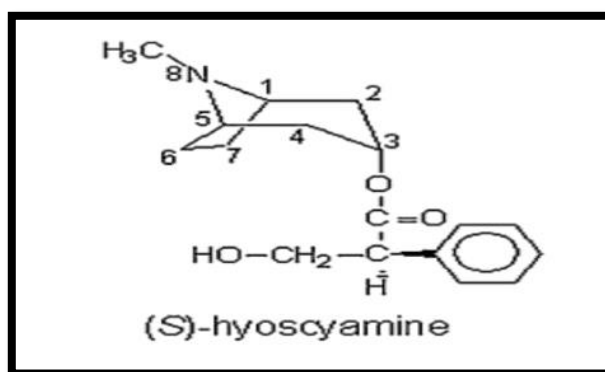


Figure 5 : structure chimique de l'hyoscyamine (**Aehle et Drager, 2010**)

II.3.1.3 La scopolamine

La scopolamine(figure 6) ou hyoscine est un ester tropique de la scopoline. Sa structure est très voisine de l'atropine et de l'hyoscyamine , mais elle possède en plus un atome d'oxygène sur le noyau tropan . La formule moléculaire de la scopolamine est $C_{17}H_{21}NO_4$ (**El Bazaoui, 2009**), est une poudre blanche, basique, dont les sels sont hydrosolubles (**Dangoumau et al., 2006**). Elle est soluble dans la plupart des solvants organiques , tel que l'éthanol, l'éther et le chloroforme (**Drager, 2002**).

Les propriétés pharmacologiques de la scopolamine sont très voisines de celles de l'atropine, mais avec des effets centraux plus marqués en raison d'une meilleure affinité avec les récepteurs

muscariniques (**Gryniewicz et Gadzikowska, 2008**). La scopolamine a une action sédatrice, hypnotique dans l'agitation psychomotrice Elle majore en intensité et en durée les effets déprimeurs des autres alcaloïdes sur le système nerveux central (**Montcriol et al., 2007**).

La scopolamine a une action sédatrice, hypnotique dans l'agitation psychomotrice, elle majore en intensité et en durée les effets déprimeurs des autres alcaloïdes sur le système nerveux central (**Montcriol et al., 2007**). 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. 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**).

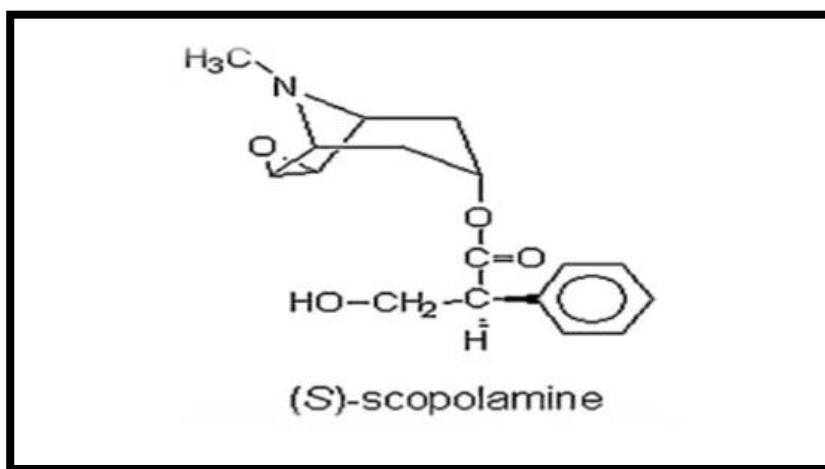


Figure 6 : structure chimique de scopolamine (**Aehle et Drager, 2010**).

II.3.1.3. 1 Pharmacocinétique

La scopolamine est rapidement absorbée par le tractus digestif (**Saviuc et al., 2010**). Elle est presque entièrement métabolisée au niveau hépatique, sauf une dose moins de 5 % reste sous forme inchangée (**Alexander et al., 2008**). La scopolamine est éliminée dans l'urine et la bile (**Desachy et al., 1997**).

II.3.1.3. 2 Mécanisme d'action

La scopolamine est un antagoniste des récepteurs muscariniques (**Roldan et al., 2001; Barguil et al., 2006; Xiang et al., 2006**).

II.3.1.3.3 Dose toxique de la scopolamine

La dose létale de la scopolamine chez l'adulte est supérieure ou égale 2-4 mg (**Perrotta et al., 1995; Lin et al., 2011**).

II..32 Distribution des alcaloïdes dans la plante

La teneur en alcaloïdes se différencie d'une partie à une autre et selon les phases et les conditions de croissances, ainsi que la région (influence du sol, climat, ...) (**Iranbakhsh et al., 2007; Marwat et al.,**

2005 ; Mirzamatov et al., 1972). La racine est le site principal de la synthèse des alcaloïdes tropaniques, ils se rencontrent surtout au niveau des épidermes, des laticifères et de façon générale dans tous les tissus en voie de croissance et ils s'accumulent surtout dans les vacuoles. Concernant leur synthèse, celle-ci se fait au niveau du réticulum endoplasmique (**Guignard et al., 1985**).

Généralement les parties jeunes de *Datura stramonium* contiennent une quantité plus élevée des alcaloïdes tropaniques que chez les parties adultes (**Miraldi et al., 2001; Iranbakhsh et al., 2006; Jakabová et al., 2012; Ricard et al., 2012**), et la partie aérienne est plus riche en alcaloïdes tropaniques que les racines (**Iranbakhsh et al., 2006**). Le tableau 3 montre la distribution des alcaloïdes tropaniques chez *Datura stramonium*.

Tableau 3 : Taux de l'atropine et la scopolamine des différentes parties de la plante de *Datura stramonium* quantifiés par GC/ SM (**Iranbakhsh et al., 2006**)

Phase de Développement et l'organe	Atropine (%)	Scopolamine (%)	Totale (%)
Feuilles dans la phase végétative	0.037	0.090	0.127
Feuilles dans la phase générative	0.030	0.020	0.050
Pétiole dans la phase végétative	0.080	0.042	0.122
Pétiole dans la phase générative	0.062	0.020	0.082
Tige dans la phase végétative	0.070	0.023	0.093
Tige dans la phase générative	0.070	0.023	0.093
Racines dans la phase végétative	0.045	0.000	0.045
Racines dans la phase générative	0.056	0.013	0.069
Capsule	0.064	0.034	0.098
Graines	0.000	0.020	0.020

II.4 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques

Dans la plante la biosynthèse des alcaloïdes est variable, elle dépend de l'espèce considérée, des conditions environnementales aux quelles l'espèce est soumise, de la période et des conditions de récolte de la plante (**Baiza et al., 1998 ; Houmani, 1994 ; Mirzamatov et al., 1972**).

La biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est désormais l'une des mieux connue parmi celles des métabolites secondaires. La production des alcaloïdes tropaniques débute à partir de la fin de la deuxième semaine après la germination (**Iranbakhsh et al., 2006; Jakabová et al., 2012**). Les principales voies de biosynthèse de l'hyosciamine et de la scopolamine sont bien connues (Figure. 8). Le noyau tropane

bicyclique est formé à partir de l'ornithine/arginine via le tropanone, tandis que le groupement acide tropique est synthétisé à partir de la phénylalanine (Alexander *et al.*, 2008).

L'hyoscyamine et la scopolamine sont issues du cycle des polyamines (arginine, ornithine, méthionine, phénylalanine), le processus de synthèse de l'hyoscyamine se fait essentiellement dans les racines par l'estérification du tropanol et de l'acide tropique, l'acide tropique est dérivé de la phénylalanine et le tropanol est issue du tropinone et de l'hygrine, une partie ensuite transporté vers les paries aériennes et l'autre transformée en scopolamine au cour de la translocation sous l'action de l'enzyme hyoscyamine-6 β -hydroxylase (Ghedjati, 2014).

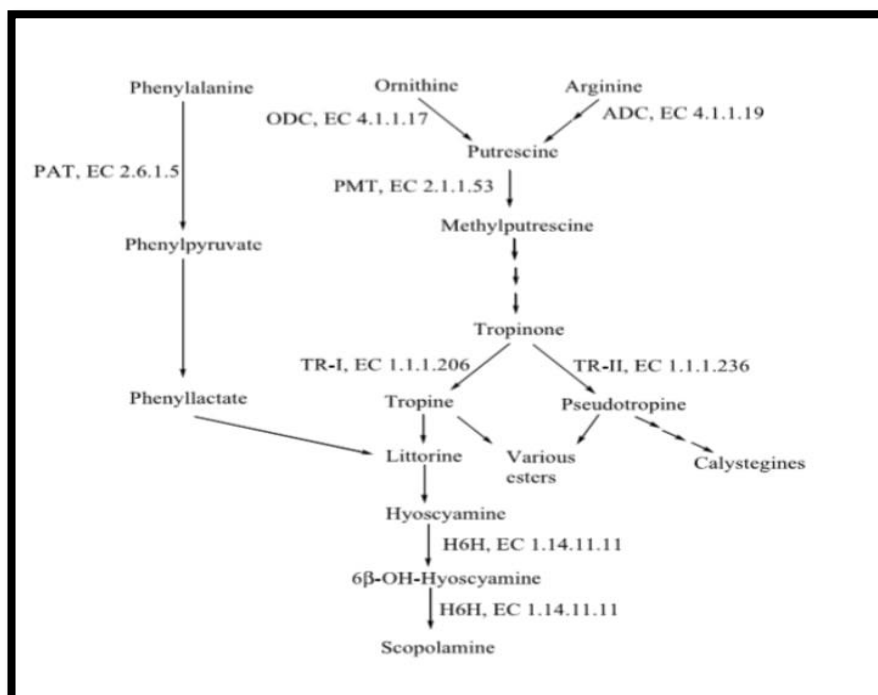


Figure 7 : Vue d'ensemble de la voie biosynthétique d'alcaloïdes tropaniques et de la catalyse enzymatique (Arroo *et al.*, 2007).

- **CDA :** Décarboxylase d'argénine.
- **H6H :** Hyoscyamine 6 α -hydroxylase.
- **ODC :** Décarboxylase d'ornithine.
- **PAT :** Phénylalanine aminotransférase.
- **PMT :** Putrescine N-méthyltransférase.
- **TR-I :** Tropine réductase I.
- **TR- II :** Tropine réductase II

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

II.5.1 Effets pharmacologiques

A. *L'atropine*

❖ Action sur le système nerveux central :

Aux doses utilisées en thérapie, l'atropine ne produit pas d'effet au niveau du système nerveux central. Aux doses toxiques, elle provoque une excitation, une agitation, des hallucinations et un coma (Katzung, 1996; Stéphan, 2002).

❖ Action sur le système nerveux autonome :

1. **Sur le cœur** : L'atropine supprime la bradycardie induite par l'acétylcholine et elle entraîne une tachycardie (Cohen, 1990).
2. **Sur les vaisseaux** : L'atropine à doses toxiques, ou même parfois thérapeutiques, dilate les vaisseaux cutanés, en particulier ceux du visage donnant un aspect rouge caractéristique (flush atropinique) (Bruneton, 1999; Goullé *et al.*, 2004).
3. **Sur l'œil** : Elle provoque une mydriase passive par paralysie de sphincter irien et une cycloplégie par paralysie du muscle ciliaire (immobilité des yeux, pupilles fixées et dilatées). Elle provoque aussi une augmentation de la pression intraoculaire (Cohen, 1990; Katzung, 1996; Stéphan, 2002).
4. **Sur les fibres lisses** : L'atropine diminue la motilité gastro-intestinale et des voies biliaires, paralysie des uretères et elle est bronchodilatatrice (Cohen, 1990; Katzung, 1996; Moulin, 1998).
5. **Sur les sécrétions** : Les sécrétions salivaires, gastriques, pancréatiques, bronchiques, lacrymales et sudorales sont freinées. Ce dernier explique l'élévation de la température corporelle « fièvre de l'atropine » (Katzung, 1996; Moulin, 1998).

B. La scopolamine

L'activité parasympatholytique de la scopolamine est identique à celle de l'atropine, mais moins marquée surtout au niveau myocardique. Néanmoins, il semble que la scopolamine, grâce à son pont époxyde dans le noyau tropane traverse mieux la barrière hémato-encéphalique (Pujol *et al.*, 2006), ce qui explique la forte puissance de la scopolamine sur le système nerveux central « SNC » que celle de l'atropine. Sur le SNC, elle provoque aux doses thérapeutiques somnolence et euphorie. Cependant aux doses toxiques, elle provoque excitation, désorientation, hallucination et délire (Beaver et Gavin, 1998; Moulin, 1998)

II.5.2 Effets d'intoxication

Toutes les parties du *Datura stramonium* sont toxiques et la plante dégage une forte odeur âcre repoussante qui rappelle celle des plantes de tabac (d'où l'appellation anglaise de "stinkweed"). Les composés anticholinergiques sont en concentrations supérieures dans les graines. La simple manutention d'une plante de *Datura*, peut s'accompagner de mydriase, particulièrement si la personne se touche l'œil. Ce phénomène réversible se produit à l'occasion chez les jardiniers ou les fermiers (Bruneton, 2001).

Le tableau clinique des personnes intoxiquées par cette plante, est dominé par les troubles du comportement : hallucinations visuelles, auditives, tactiles, désorientation spatio-temporelle, agitation motrice, rougeur de la face, une mydriase, délire, tachycardies, hyperthermie. Dans les cas les plus graves, on peut observer des convulsions, une détresse respiratoire et le coma. Pour rappel, en 1666, près de la ville de James Town en Virginie (USA), des soldats furent intoxiqués en masse, après avoir consommé plusieurs plantes de *Datura stramonium* en guise de repas (en pensant que c'était des

épinards). Cet événement est à l'origine du nom «Jimson Weed » utilisé pour désigner le Datura et qui vient de contraction des mots « Jamestown » et « Weed » (Arouko *et al.*, 2003).

En Algérie, les intoxications par les *Datura* ont lieu généralement en période estivale et au début de l'automne, son caractère cosmopolite et ses propriétés anticholinergiques font d'elle une plante toxique pour les adolescents (à la recherche de sensation) ou les toxicomanes (Bouzidi *et al.*, 2002).

II.6 Extraction et dosage des alcaloïdes

II.6.1 Extraction des alcaloïdes de *Datura stramonium*

Il existe 4 techniques d'extraction chimiques des alcaloïdes

II.6.1.1 Extraction par solvants organiques

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment, le dichlorométhane et l'acétone (Legrand, 1993 ; Dapkevicius *et al.*, 1998 ; Kim & Lee, 2002). Une extraction par solvant consiste à extraire une espèce chimique d'un milieu solide ou liquide par solubilisation dans un solvant. Lorsque l'espèce chimique est extraite d'un liquide (mélange ou solution), ce liquide et le solvant extracteur doivent être non miscibles. Au cours de l'extraction on obtient deux phases (ou parties non mélangées). La phase supérieure correspond au liquide dont la densité est la plus faible. (Bruneton, 1993).

II.6.1.2 Extraction par un solvant en milieu alcalin

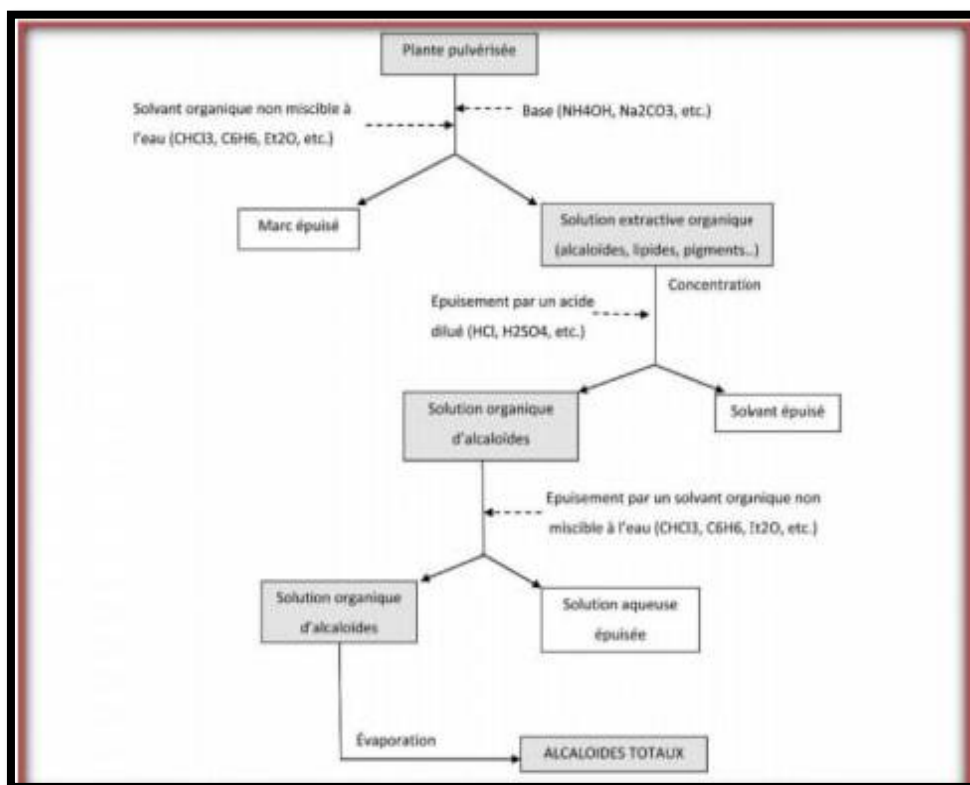


Figure 8 : Principe de l'extraction des alcaloïdes en milieu alcalin (Bruneton, 2009).

II.6.1.3 Extraction par un solvant en milieu acide

Deux cas peuvent se présenter : dans le premier, la plante ou partie de la plante pulvérisée est directement épuisée par de l'eau acidifiée dans le second cas , c'est avec une solution alcoolique ou hydro-alcoolique acidifiée qu'est réalisé l'épuisement dans ce cas de figure, l'extraction est suivie d'une distillation sous vide qui élimine l'alcool. et laisse une solution aqueuse acide de sels d'alcaloïdes. Dans les deux cas, on a donc une solution aqueuse de sels d'alcaloïdes qu'il faut purifier. On peut :

- ✓ alcaliniser la solution et extraire les bases par un solvant organique non miscible.
- ✓ fixer sélectivement les alcaloïdes contenus dans la solution sur une résine échangeuse d'ions puis les éluer à l'aide d'un acide fort.
- ✓ précipiter les alcaloïdes sous la forme d'iodomercures. Le complexe formé est récupéré par filtration, solubilisé dans un mélange hydro-alcool-acétonique et décomposé par passage sur une résine échangeuse d'ions (**Bruneton, 2009**).

II.6.1.4 Macération

Très simple, cette préparation s'obtient en mettant les plantes en contact, à froid, avec un liquide quelconque. Ce liquide peut être du vin (vin de Gentiane), de l'alcool (alcoolature d'Ail, teinture de Boldo), de l'huile (huile de Serpolet). Le temps de contact est parfois très long. Les macérations à l'eau, plus rarement employées, car elles ont l'inconvénient de fermenter facilement, ne doivent pas, de toute manière, excéder une dizaine d'heures (**Gildemeister & Hoffmann, 1919**). C'est une technique au cours de laquelle on immerge longuement des matières végétales dans un liquide froid afin d'en extraire les espèces chimiques solubles dans ce liquide (**Paul et al., 2001**).

II.6. 2 Dosage des alcaloïdes

Le dosage des alcaloïdes totaux a été réalisé sur des feuilles prélevées au niveau intermédiaire des plantes pour toutes les provenances et toutes les espèces. Le prélèvement a été effectué au stade pleine floraison (60 JAS).

D'après **Paris et Hurabielle (1981)**, les principales méthodes d'identification et de dosage sont :

- La méthode pondérale où l'on précipite l'alcaloïde sous forme de sel insoluble.
- La méthode volumétrique ou alcalimétrique, en précipitant les alcaloïdes par le réactif de Valser-Meyer.
- La méthode colorimétrique qui est basée sur la réaction colorée plus au moins spécifique à l'alcaloïde.
- Les méthodes chromatographiques en phase gazeuse (CPG) ou liquide (HPLC), ou en couche mince (CCM).

Le dosage s'effectue le plus souvent, en utilisant les techniques de chromatographie sur couche mince (Paris et Hurabielle, 1981), en phase gazeuse, ou en phase liquide couplées ou non à un spectromètre de masse. La chromatographie a pour objectif de séparer les molécules de l'extrait brut, et la

spectrométrie de masse sert à identifier et à quantifier les différentes molécules sur la base de leurs spectres de masse. A défaut d'un spectromètre de masse, on fait appel à des standards pour identifier et quantifier les molécules cibles (**Morsli, 2013**).

III. La maladie du chevelu racinaire

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*

Depuis sans doute des millions d'années, des bactéries du sol accomplissent des transferts naturels de gènes dans les plantes. A l'occasion d'une blessure, elles introduisent, dans le génome nucléaire des hôtes qui leur sont sensibles, une partie de leur ADN plasmidique qui est ensuite capable de s'y exprimer (**Harfi, 2009; Chilton, 1983**). Ces bactéries sont des Rhizobiacées Gram- du genre *Agrobacterium*.

Agrobacterium rhizogenes :Bactérie provoquant la maladie du « chevelu racinaire;hairy root » (**Riker et al.,1930**) chez certaines plantes, similaire à la maladie de la galle du collet provoqués par *Agrobacterium tumefaciens*; ceci est réalisé par la mobilisation d'une partie (l'ADN-T) du plasmide Ri (root inducing) bactérien et de son intégration dans le génome de certaines cellules de la plante infecté. Ce processus est utilisé pour insérer des gènes Étrangers dans les cellules végétales, mais dans une moindre mesure que la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. En effet, la régénération d'une plante entière à partir des cultures de racines « chevelues » peut être problématique.

Ces bactéries se présentent sous forme de bacilles de 0,6 à 1 µm de largeur et de 1,5 à 3 µm de longueur. Elles sont mobiles grâce à 1 à 6 flagelles et ne font pas de spores. Elles vivent en aérobie, car elles possèdent un métabolisme du type respiratoire avec l'oxygène comme dernier accepteur d'électrons. Elles sont toutefois capables de croître sous de tensions réduites d'oxygène dans les tissus de la plante. La température optimale de croissance est de 25°C à 28°C. En milieu solide, elles forment des colonies convexes, circulaires, lisses et de couleur beige clair (**Chriqui, 1998**).

III.2 Plasmide Ri

Le plasmide Ri est caractérisé par sa grande taille (200 à 800 kb) et contient deux régions nécessaires à l'infection, la région de l'ADN-T (ADN transféré) destinée pour être transféré à la cellule végétale et la région *vir* (virulence). L'ADN-T est délimité par 24 pb de séquences d'ADN répétées (**Slightom et al., 1986**).

Un certain nombre de groupes de plasmides Ri (pRi) ont été caractérisés. La classification de ces plasmides dépend des types d'opines (Tableau 4) auxquels les ADNT orientent la synthèse de la plante infectée (Lahnert *et al.*, 1984).

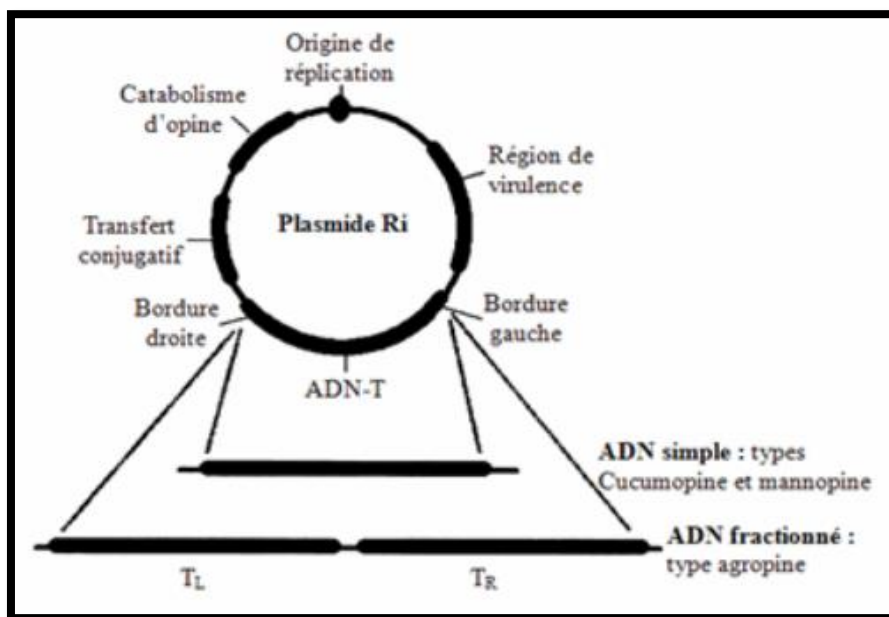


Figure 9 : Structure du plasmide Ri (Veena et Taylor., 2007).

Tableau 4 : Principales opines servant à la classification des plasmides Ri d'*A. rhizogènes* (Chriqui, 1998).

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

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

Le mécanisme de transformation génétique infectées sur les plantes par cette bactérie se fait en trois étapes :

- ❖ **Adhésion bactérie-plante** : Cela nécessite d'abord une reconnaissance de la cellule végétale par la bactérie qui s'attache à la paroi de celle-ci. Les fonctions de reconnaissance sont portées par le chromosome bactérien (Casse-Delbart, 1990).
- ❖ **Activation des gènes vir** : L'activation du processus d'infection est régulé par les gènes *vir A* et *vir G* situés sur le T-DNA et certain gènes chromosomiques. Les gènes *vir* sont activés par trois types de signaux chimiques que la plante relâche en cas de blessure: Les composés phénoliques de type syringone, les monosaccharides (tels que le glucose et l'acide glucorinique) et le pH acide (Liang *et al.*, 1998; Giri et Narasu, 2000).

❖ **Insertion du T-DNA dans le génome nucléaire de la plante hôte** : au cours de cette étape le T-DNA entre les régions TR (Right) et TL (Left) du plasmide Ri (pour « root induction ») s'intègre au génome nucléaire de la plante hôte. L'expression des gènes portés par le T-DNA conduit à la formation de chevelus racinaires au niveau du site d'infection et la production des opines qui servent de substances de croissances pour la bactérie (**Moyano et al., 1999 ; Zhi-Bu et Min, 2006**).

Les chevelus racinaires formés comme réponse à l'infection par cette bactérie peuvent être isolés de la plante et cultivés en conditions axéniques sur milieu sans hormones (**Flores et Medina-Bolivar, 1995**). Le caractère transgénique des chevelus racinaires peut être confirmé par la détection des opines ou des fragments d'ADN dérivé du T-DNA intégré dans le génome de la plante hôte (**Parr et al., 1988 ; Moyano et al., 1999 ; Srivastava et Srivastava, 2007**). Morphologiquement, les chevelus racinaires sont reconnaissables par une croissance plagiotrope, une forte ramification et développement de poils absorbants à haute densité (**Bandyopadhyay et al., 2007 ; Veena et Taylor, 2007**).

III.4 Intérêts de la culture des chevelus racinaires

Les cultures de chevelus racinaires sont caractérisées par un taux de croissance élevé et peuvent synthétiser les métabolites secondaires dérivant des plantes d'origine. Naturellement, les cultures de racines ont besoin d'un apport exogène en phytohormone et ont un rythme de développement très lent ayant pour résultat une faible synthèse de métabolites secondaires. Cependant, l'utilisation de la culture des chevelus racinaires a révolutionné le rôle des cultures de tissus végétaux pour la synthèse de métabolites secondaires. Ces chevelus racinaires sont uniques et ils sont caractérisés par une stabilité génétique et biosynthétique, une croissance rapide, leur facilité d'entretien et leur capacité de synthétiser une grande gamme de composés chimiques avec un avantage additionnel comme source continue de production de métabolites secondaires (**Hamill et al., 1986 ; Mukundan et al., 1998**).

A fin d'obtenir des cultures de chevelus racinaires à haute densité, il est nécessaire de maintenir les conditions de culture au niveau optimum. Ces cultures suivent un modèle de croissance définie, toute fois, la production de métabolites secondaires n'est pas proportionnellement liée à la croissance. Des racines transformées de plusieurs espèces ont été largement étudiées pour la production *in-vitro* de métabolites secondaires (**Hamill et al., 1986 ; Mukundan et al., 1998**). Des lignées de chevelus racinaires peuvent être une source prometteuse pour la production normalisée de métabolites secondaires. Ces cultures de chevelus racinaires produisent des métabolites secondaires génération après génération sans perte de la stabilité génétique et biosynthétique, cette propriété peut être utilisée pour des manipulations génétiques dans le but d'augmenter la capacité biosynthétique (**Giri et Narasu, 2000**). Ainsi, l'*A. rhizogenes* contribue à la transformation de plantes et à la production de plantes transgéniques à usage biotechnologique (**Veena, 2007**).

L'un des intérêts le plus important des cultures de racines transgéniques réside dans la facilité de l'étude de voies de biosynthèse de molécules phytochimiques dédiées à l'industrie pharmaceutique (alcaloïdes, terpènes et phénols) ainsi que la production des protéines thérapeutiques recombinées (vaccins, anticorps et enzymes) produits ou convertis dans les racines ainsi que l'étude de la physiologie des racines et la toxicité de certaines molécules et métaux lourds en contact des racines des plantes. Pour certaines espèces ornementales les chevelus racinaires sont utilisés pour la régénération de plantes entières avec des phénotypes désirés en introduisant de nouveaux caractères grâce à la recombinaison génétique (Ono et Tian, 2011).

III.5 Facteurs influençant l'induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* :

- a. Effet de la souche et de la concentration bactérienne :** la réponse de la plante à la transformation génétique dépend de la souche bactérienne utilisée (Ercan et Taskin, 1999) . la concentration bactérienne joue un rôle très important dans l'efficacité d'induction des CRs chez les plantes . une faible concentration se traduit par une faible disponibilité des bactéries pour la transformation alors qu'une forte concentration diminue l'efficacité de la transformation à cause de l'inhibition compétitive entre les bactéries (Tao et Li , 2006), en général, la meilleure concentration bactérienne se situe au niveau d'une DO (600 nm)= 0.5 (Dhakulkar et al., 2005).
- b. Effet de génotype et de l'âge du tissu :** le succès de la transformation dépend de différents paramètres tels que le génotype et l'âge du tissu. en générale, les jeunes plantes ont plus sensibles à une infection bactérienne (Sevon et Oksman-Caldentey, 2002).
- c. Effet de la température :** les gènes *vir* des souches d'*Agrobacterium* ne s'expriment pas à des températures supérieures à 32°C (Jin et al., 1993).
- d. Effet du pH :** le pH acide (pH 5.7) induit en générale plus de virulence (Lièvre, 2004).
- e. Effet des composées phénoliques :** des composées phénoliques activateurs de la virulence comme l'acétosyringone qui ajoutés au milieu de suspension bactérienne, améliorent l'induction des CRs (Sahli et Gadiri,2015).
- f. Effet des monosaccharides :** le fructose, le galactose, le glucose et le xylose activent les gènes *vir* . parfois leur apport est nécessaire pour transformer certaines plantes (Ankebauer et Nester, 1990). Cet effet est accentué en présence d'acétosyringone (Sahli et Gadiri ,2015).

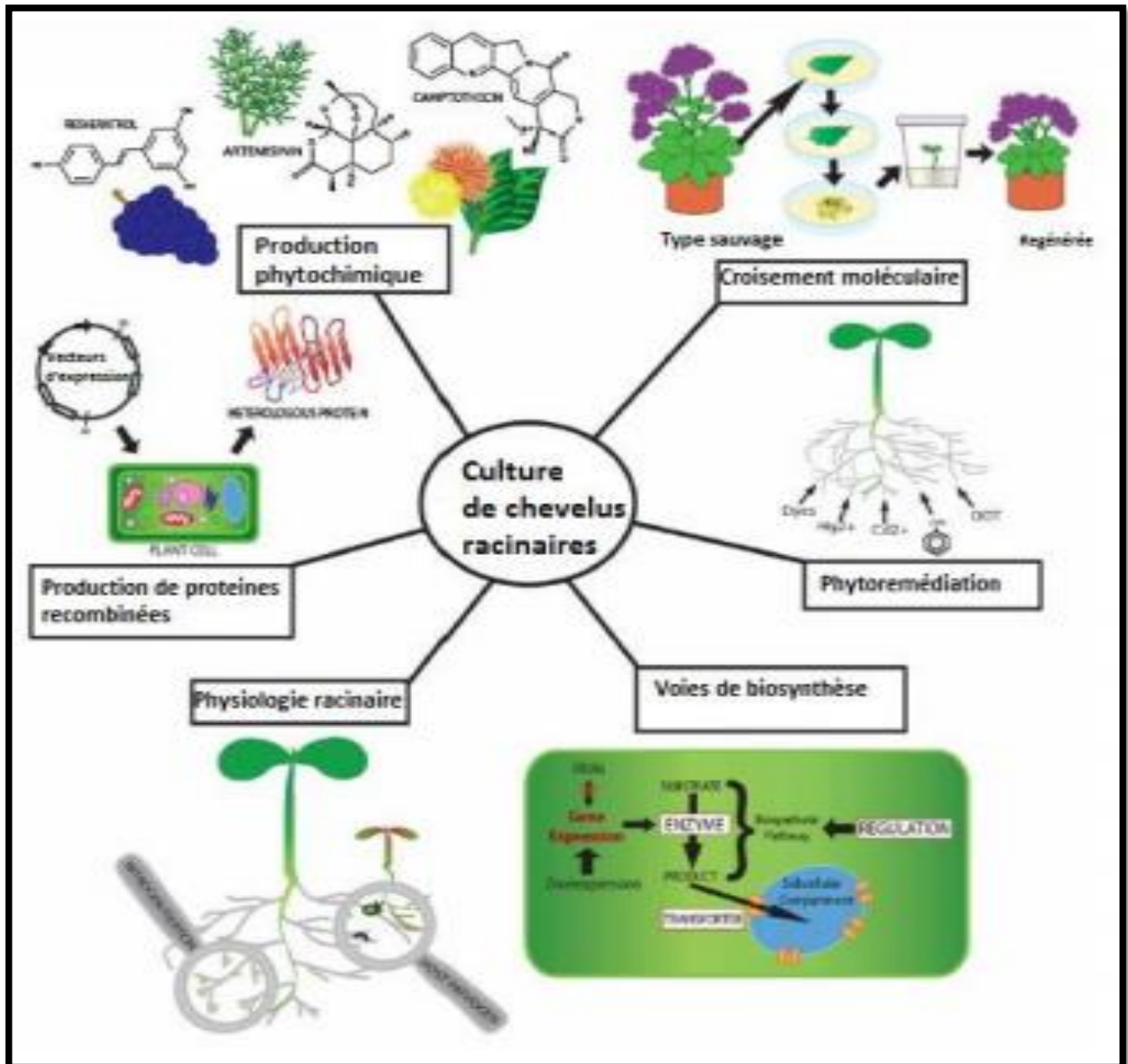


Figure 10 : Différentes applications biotechnologiques des cultures de racines transgéniques (Ono et Tian, 2011)

IV. La production des alcaloïdes à partir de chevelus racinaires

Le genre *Datura* est largement étudié pour 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**). 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**).

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 ; Verpoorte et al., 2002**).

Les milieux de culture de base couramment utilisés pour la culture *in vitro* d'organes, tissus ou cellules végétales destinés à la production de métabolites secondaires sont : MS (**Murashige et Skoog, 1962**); B5 (**Gamborg, 1970**); WP (**Woody Plant Medium, Lloyd et McCown, 1980**) et le milieu LS (**Linsmaier et Skoog, F.1965**). Parfois des dilutions à moitié (1/2) ou au quart (1/4) de la formulation originale de ces milieux sont utilisées par certains auteurs (**Parr et al., 1988 ; Hilton et Rhodes, 1990 ; Nussbaumer et al., 1998 ; Nishiyama et Yamakawa, 2004**). Le choix d'un milieu ou d'un autre est justifié par ses effets sur la croissance et l'accumulation des produits d'intérêt.

Du fait que chaque chevelu peut avoir des besoins différents en nutriments, les conditions du milieu de culture doivent être optimisées pour chaque espèce ou plutôt pour chaque lignée racinaire (**Zhi-Bu et Min, 2006**). Ceci se fait par la manipulation aussi bien des composantes nutritionnelles que des constituants du milieu physique. Les facteurs nutritionnels les plus étudiés dans le but d'améliorer la croissance et l'accumulation des métabolites secondaires consistent en la source du carbone et sa concentration (**Oksman- Caldentey, 1994 ; Yu et al., 1996 ; Nishiyama et Yamakawa, 2004**), la concentration du phosphore et du potassium (**Sikuli et Demeyer, 1997**), la concentration et la source de l'azote (**Oksman-Caldentey, 1994 ; Nussbaumer et al., 1998, Amdoun et al., 2009**), le calcium (**Gontier et al., 1994 ; Pinol et al., 1999 ; Amdoun et al., 2009**), les métaux lourds et les phytohormones (**Rhodes et al., 1994 ; Pitta-Alvarez et Giulietti, 1997 ; Smith et al., 1997**) et les précurseurs de biosynthèse des produits d'intérêt (**Nussbaumer et al., 1998 ; Boitel- conti et al., 2000**).

L'environnement de culture, quand à lui est manipulé en jouant sur la lumière (Nishiyama et Yamakawa, 2004), la température (Hilton et Rhodes, 1990 ; Yu *et al.*, 1996), l'agitation et l'aération (Lee *et al.*, 1998a ; Williams et Doran, 1999), le pH et la pression osmotique du milieu (Yu *et al.*, 1996). Les caractéristiques de l'inoculum ont aussi une influence considérable sur la croissance et la production de métabolites secondaires (Zhi-Bu et Min, 2006).

IV.2 L'élicitation

Le rôle majeur des métabolites secondaires est la protection des plantes contre les attaques des herbivores, des insectes et des pathogènes ou d'assurer la survie aux stress abiotiques (Zarouri, 2012) ; Les plantes répondent à l'attaque des pathogènes, des ravageurs ainsi qu'aux agressions occasionnées par les conditions du milieu environnant, par l'activation d'une série de mécanismes de défense qui amènent au déclenchement de la biosynthèse des métabolites secondaires dont les phytoalexines et les alcaloïdes (Hutcheson, 1999 ; He *et al.*, 2002 ; Vasconsuelo et Boland, 2007 ; Moussous, 2019) ; L'élicitation des plantes ou leurs tissus cultivés *in vitro* est une stratégie basée sur ce principe qui a été développée à fin d'améliorer le rendement et la productivité des métabolites secondaires dans les cultures cellulaires/tissulaires *in vitro* (Zhao *et al.*, 2005).

L'Élicitation est l'induction ou l'augmentation de la biosynthèse des métabolites par l'addition de traces d'éliciteurs (Radman *et al.*, 2003). Un éliciteur peut être défini comme étant un composé organique ou un facteur physique ou chimique qui provoque chez la plante hôte quand il est ajouté à son environnement une réaction similaire aux réactions de défense contre les stress biotiques ou abiotiques.

Le terme « **éliciteur** » s'appliquait à l'origine aux molécules susceptibles d'induire la production de métabolites secondaires (Gadzoska *et al.*, 2004). Il est maintenant utilisé pour l'ensemble des molécules qui induisent des réactions de défense chez les plantes (Moussous, 2019). Les éliciteurs sont généralement classés en deux grandes classes :

1. Éliciteurs abiotiques

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

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

- De nature physique ou chimique fonctionnant par l'intermédiaire des éliciteurs biotiques formés de manière endogène.
- Des rayons UV ou des protéines dénaturées.
- Des composants non essentiels du milieu de culture (agarose, étain).
- Des métaux lourds.
- D'une grande affinité avec l'ADN.
- Des fongicides (Maneb, Buthylamine).

- Des herbicides (Acifluoronfen).

2. *Eliciteurs biotiques* :

Les éliciteurs biotiques sont des substances d'origine organique. Ils comprennent des polysaccharides dérivés des parois cellulaires de la plante (pectine ou cellulose), les microorganismes (chitine ou glucane) et les glycoprotéines. La glycoprotéine 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**). Ce groupe peut être divisé en deux sous groupes : Les éliciteurs exogènes (issues de pathogènes) et les éliciteurs endogènes ou constitutifs des plantes (**Yeoman et Yeoman, 1996**).

Selon **Namdeo (2007)**, les principaux éliciteurs biotiques sont :

- Directement libérés par des micro-organismes et reconnus par la cellule de la plante (enzymes, fragments de paroi cellulaire).
- Formés par l'action des micro-organismes sur la paroi cellulaire de la plante (fragments de pectines et autres).
- Formés par l'action des enzymes de la plante sur les parois des cellules microbiennes (chitosane, glucane).

Plusieurs protocoles basés sur l'élicitation ont été développés pour améliorer le rendement en alcaloïdes tropaniques (**Moharrami et al., 2017**). Le tableau résume quelques recherches ayant abouti à des taux de production d'alcaloïdes tropaniques importants chez les différentes espèces de *Datura* :

Tableau 5: Résumé de quelques travaux d'élicitation de la production des alcaloïdes tropaniques chez *Datura* (Moussous, 2019).

Espèce	Organe de production	Eliciteurs	Alcaloïdes Extraits	Référence
<i>D. stramonium</i>	Racines de la plante entière	Acide salicylique Lysinibacillus fusiformis Pseudomonas plecoglossicida	Hyoscyamine	(Rahmoun <i>et al.</i> , 2017)
<i>D. stramonium</i> <i>D. tatula</i> <i>D. innoxia</i>	Racines transgéniques	Stress salin (CaCl ₂ , KCl)	Hyoscyamine	(Harfi <i>et al.</i> , 2015)
<i>D. metel</i>	Racines transgéniques	AgNO ₃ Staphylococcus aureus Bacillus cereus Nanoparticules de cuivre	Atropine	(Shakeran <i>et al.</i> , 2015)
<i>D. stramonium</i>	Suspensions cellulaires	Nitrates d'ammonium CaCl ₂ Kinetine	Hyoscyamine	(Iranbakhsh <i>et al.</i> , 2007)
<i>D. stramonium</i>	Racines de la plante entière	Chlorsulfuron Glyphosate MeJa	Tropine	(Fan Deng., 2005)
<i>D. stramonium</i>	Racines transgéniques	Methyljasmonate (MeJa) Extrait de levure Oligogalacturonide	Littorine Hyoscyamine Scopolamine	(Zabetakis <i>et al.</i> , 1998)
<i>D. stramonium</i>	Racines transgéniques	Cellulase CuSO ₄ CdCl ₂ Pb(NO ₃) ₂ HAuCl ₄	Hyoscyamine Lubimine 3-Hydroxy lubimine	(Jutith <i>et al.</i> , 1990)

IV.3 L'utilisation de précurseurs

L'utilisation de précurseurs est une Stratégies biotechnologiques a été largement appliquée pour améliorer la Production de métabolites secondaires dans les chevelus racinaires des plantes médicinales. L'ingénierie des métabolites secondaires dans les chevelus racinaires a été réalisée par la manipulation génétique de gènes clés pour la biosynthèse de précurseurs, la disponibilité de ce dernier est un facteur important affectant la production de composés cibles. (Shi *et al.*, 2020).

Le concept est basé sur l'idée qu'un composé, qui est un intermédiaire dans le commencement d'un itinéraire biosynthétique de métabolite secondaire, stimule une bonne augmentation du rendement du produit final. Dans beaucoup de cas, les acides aminés ont été employés en tant que précurseurs peu coûteux de métabolites secondaires. Ils ont été ajoutés aux milieux de culture de suspensions cellulaires pour la production des alcaloïdes tropaniques, indoliques etc (SMETANSKA, 2008).

D'après Evans, (2009), le précurseur administré peut ne jamais avoir atteint le site de synthèse nécessaire dans la plante, ou la plante peut ne pas, avoir synthétisé le constituant étudié au moment des expériences, comme chez les vieux plants de *Datura stramonium* l'arrêt de la production de l'hyoscyamine étaient l'un de l'origine de résultats trompeurs dans les études sur les alcaloïdes.

IV.4 L'immobilisation des cellules

L'immobilisation a été caractérisée comme une technique qui confine une enzyme ou une cellule catalytiquement active et empêche son entrée dans la phase mobile, qui porte le substrat et le produit, cette technique pourrait maintenir des cellules viables sur une longue période de temps et libérer la majeure partie du produit dans le milieu extracellulaire sous une forme stable, pourrait réduire considérablement les coûts de production phytochimique en culture cellulaire végétale, Pour l'utilisation des cellules immobilisées devrait évité l'extraction directe des composés de la biomasse pendant que les produits surgissent dans le milieu lui-même (SMETANSKA, 2008).

Les cellules végétales immobilisées peuvent être utilisées de la même manière que les enzymes immobilisées pour effectuer des réactions chimiquement difficiles (Evans, 2009). Il est considérée comme importante dans la recherche et le développement dans les cultures de cellules végétales, en raison des avantages potentiels que pourrait être fournie :

- La viabilité prolongée des cellules (produisant à l'étape stationnaire), permettant l'entretien de la biomasse sur une période de temps prolongée;
- Réduction du risque de contamination ;
- Sensibilité réduite de cisaillement (particulièrement avec les cellules enfermées) ;
- Attribution à la sécrétion de métabolite secondaire, dans certains cas ;
- Minimisation de l'augmentation de la viscosité du fluide, qui dans les suspensions cellulaires cause des problèmes d'aération (SMETANSKA, 2008).

IV.5 La perméabilisation des cellules (des chevelus racinaires)

Les chevelus racinaires sont cultivés dans des flacons coniques de 250 ml, contenant 50 ml de milieu de culture liquide de type B5 (Gamborg *et al.*, 1968) additionné de 20 g/l de saccharose. La culture est conduite dans l'obscurité sous agitation à 100 rpm et à une température de 26 ± 1 °C. Afin d'inciter les chevelus racinaires à libérer l'hyoscyamine dans le milieu de culture, trois concentrations de Tween 20 (0,5%, 1% et 2%) et deux concentrations de peroxyde d'hydrogène (5mM et 10mM) ont été utilisées séparément comme agents de perméabilisation. Pour chaque

concentration, deux variantes ont été testées : 1- agents de perméabilisation ajoutés au début de la culture 2- agents de perméabilisation ajoutés 24 heures avant de récolter le milieu de culture. Le témoin étant le milieu de culture B5 sans agent de perméabilisation. Après deux semaines de culture, le milieu est récupéré. L'effet du Tween 20 et du peroxyde d'hydrogène sur la viabilité des chevelus racinaires est évalué par les poids frais (PF) et sec (PS) des chevelus. L'hyoscyamine libérée par les chevelus racinaires (TH) est alors extraite à partir du milieu de culture (**khlifi et al., 2009**)

Deuxième partie: MATERIELS ET METHODES

I. Objectif du travail

Les plantes représentent une source pratiquement illimitée de métabolites primaires et secondaires ; les métabolites secondaires sont d'intérêt majeur à cause de leurs différentes fonctions et de la gamme impressionnante de leurs activités biologiques (L'Ecuyer-Coelho, 2000) ; le *Datura stramonium* figure parmi ces plantes présentant un intérêt pharmaceutique majeur, ainsi l'objectif de notre travail consiste à étudier :

- Obtention des vitro-semis
- L'induction de chevelu racinaire chez *Datura stramonium* en vue de production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique par d'*Agrobacterium rhizogenes*.
- Sélection des lignées racinaires performantes après l'isolement des racines et multiplication des chevelus racinaires sélectionnés.

NB : dans notre expérimentation nous n'avons fait que la partie **Obtention de vitro-semis** (à cause de la pandémie du virus Covid 19), le reste est considéré comme une synthèse bibliographique des travaux déjà réalisés dans les années précédentes.

II. Obtention des vitro-semis

Des vitro-semis obtenus à partir de graines matures de *Datura stramonium* sont utilisés pour prélever les hypocotyles destinés à la transformation.

II.1 Origine des graines de *Datura stramonium*

Les graines de *Datura stramonium* L, sont récoltées dans les populations à originaires d'Oran, maintenues en collection, depuis plusieurs années à l'E.N.S.A – El-Harrach, Alger (Ex-I.N.A.).

II.2 Scarification des graines

La scarification des grains a été réalisée mécaniquement selon la méthode préconisée par **Khelifi-Slaoui et al. (2005)**, qui consiste à frotter les graines entre deux papiers vert (point 80) pour destruction ou élimination du tégument.

II.3 Désinfection des graines

Les graines scarifiées ont été désinfectées dans l'éthanol 70°, ensuite dans l'hypochlorite de sodium (d'eau de javel) 12° pendant 10 minutes suivi dans 3 à 4 rinçages par l'eau distillée déjà stérilisée dans l'autoclave pendant 20 minute, enfin laissées séchées sur du papier filtre stérile (figure 11) .



Figure 11: Grains scarifiées et désinfectés (stérile)

II.4 Mise en culture

Les graines sont ensemencées dans des tubes contenant 20 ml de milieu MS (**Murashige et Skoog, 1962**) additionné de 7g/l d'agar et 20g/l de saccharose (tableau 6). Les tubes ainsi ensemencés sont placés dans la chambre de culture à une température de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ et une photopériode de 16 h (figure 12).

a. Préparation du milieu de culture

- La première étape : préparer les solutions mères de macro et micro-éléments, de la vitamine et de Fer.
- La deuxième étape : préparer 1L de milieu MS (**Murashige et Skoog**) dans un erlen-meyer de 1L (1000 ml) verser quelques ml d'eau distillé ensuite verser :
 - 50 ml des macroéléments
 - 10 ml de microéléments
 - 10 ml de vitamines
 - 10 ml de Fer
- Ajuster avec l'eau distillé Jusqu'au 1L .
- Ajouter de 20 à 30 g de saccharose.
- Placer la solution sur l'agitateur magnétique pour l'agitation
- Ajuster le pH à (5.6-5,8)
- Ajouter 7g d'Agar-agar avec l'agitation et le chauffage
- Autoclaver le milieu à 120°C pendant 20 min.



Figure 12 : le milieu MS dans les tubes et les erlenmeyers

Tableau 6 : Composition du milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962).

Eléments	Formule chimique	Concentration (mg/l)
Macroéléments	NH_4NO_3	1650
	K NO_3	1900
	$\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	440
	$\text{Ca Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	370
	$\text{K H}_2\text{PO}_4$	170
Microéléments	H_3BO_3	6,20
	$\text{Mn SO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	22,30
	$\text{Zn SO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	8,60
	KI	0,83
	$\text{Na}_2 2\text{Mo O}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
	$\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CO Cl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Fer EDTA	$\text{Fe SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	27,85
	$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	37,25
Vitamines	Glycine	2,00
	Acide nicotinique	0,50
	Pyridoxine HCl	0,50
	Myo inositol	100

b. Mise en culture

- Se laver soigneusement les mains, puis les désinfecter avec de l'alcool.
- Allumer la hotte et désinfecter le plan de travail et les parois latérales avec l'hypochlorite de sodium puis par de l'éthanol.
- Placer le bec benzène au centre du plan de travail et l'allumer pour avoir une flamme bleue.
- Placer les graines stériles a coté du bec benzène.
- Mise en culture des graines dans des tubes à essai contenant 20 l du milieu MS



Figure 13: Grains cultivées dans un milieu MS posées dans la chambre de culture

III. Obtention des chevelus racinaires

III.1 Origine de l'agrobactérie

La souche A4 utilisée dans notre travail est originaire de la Californie (Etats-Unis), elle est isolée par Dubrin (**Bouzar, 1983**). C'est une souche à agropine (**Lambert *et al.*, 1988**). Elle porte le plasmide Ri dont l'ADN-T est constitué de 2 segments, TL-DNA (le ft DNA) Et TR-DNA (right-DNA) (**Giri et Narasu, 2000 ; Tao et Li, 2006**). Elle nous a été fournie par le laboratoire de microbiologie de l'université de Blida.

III.2 Préparation de la suspension bactérienne

La souche bactérienne est conservée à l'obscurité dans le milieu YEM (**Vincent, 1970**) (est un milieu d'isolement et d'entretien des bactéries en biologie végétale ; Tableau 7), à une température de -4°C

Tableau 7: Composition chimique du milieu YEM (**Vincent, 1970**)

Composition chimique	Concentration (mg/l)
K_2HPO_4	500
$\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$	200
Na Cl	100
Extrait de levure	400
Mannitol	10000

a. Activation de l'agrobactérie

L'activation consiste àensemencer les bactéries sur un milieu de culture YEM neuf de pH 7 et les mettre en incubation à l'obscurité, à une température de $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 48 à 72 heures. Une partie des

bactéries activées est utilisée pour la préparation des suspensions, l'autre partie est remise en conservation pour les prochaines manipulations (figure 14).

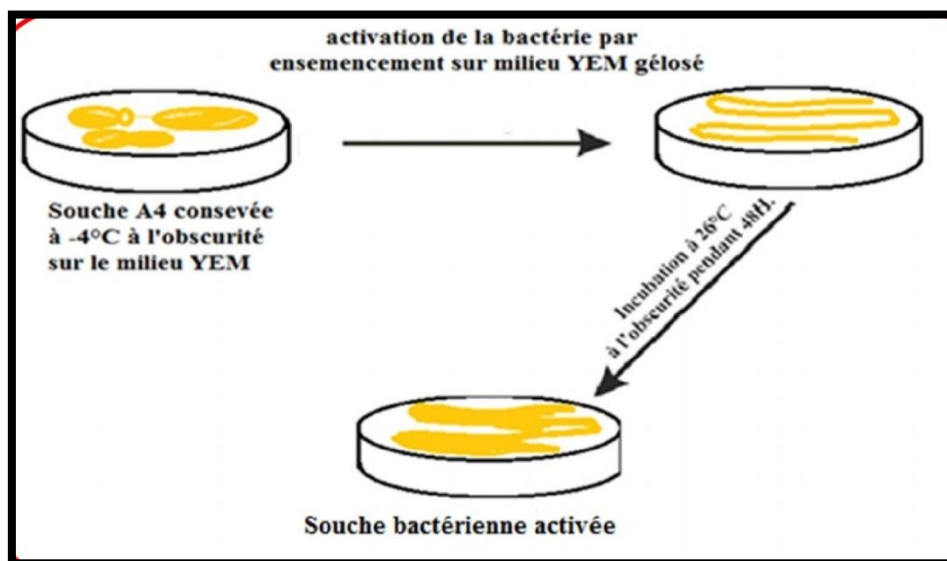


Figure 14 : Activation de la souche A4

b. Mise en suspension des souches bactériennes

Cette étape consiste à ensemencer la souche préalablement activée dans le milieu de culture YEM liquide pendant 72 heures (environ 10^6 germes/ml). L'incubation des bactéries en suspension est réalisée dans l'obscurité à $27 \pm 1^\circ\text{C}$ dans un incubateur-agitateur réglé à 80 rpm (figure 15)

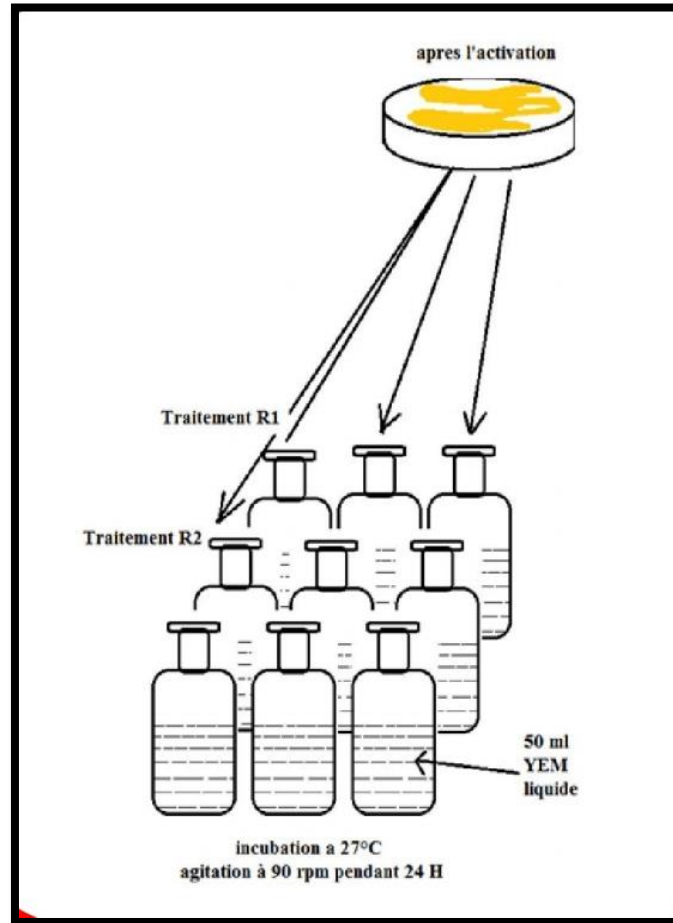


Figure 15 : Protocole de préparation de suspension bactérienne.

c. Inoculation et Co-culture plante-bactérie

L'inoculation se fait par simple dépôt à l'aide d'une seringue au niveau de la section basale des fragments d'hypocotyles de 0,5 à 1 cm de longueur. Ils sont ensuite déposés, selon une polarité inversée, à raison de 4 explants par boîte de pétri, sur milieu MS contenant 250 mg/l de céfotaxime (antibiotique). La Co-culture est réalisée dans l'obscurité et à $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Amdoun *et al.*, 2005).

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.

III.3 Isolement des racines transformées

Les racines transformées qui apparaissent sur les explants inoculés sont excisées lorsqu'elles atteignent environ 2 cm de longueur. Elles sont transférées sur milieu MS solide additionné de 250 mg de céfotaxime afin d'éliminer les bactéries qui accompagnent éventuellement ces racines. Des repiquages sur des milieux contenant de moins en moins d'antibiotique sont nécessaires. 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.

III.4 Multiplication des lignées racinaires obtenues

Les lignées racinaires obtenues sont entretenues dans des boîtes de Pétri contenant environ 20 ml de milieu de culture B5 semi-solide additionné de 5 g/l d'agar et de 20 g/l de saccharose. Les conditions de culture sont : Obscurité totale, température de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et pH ajusté à 5,6 - 5,8. La fréquence de multiplication des lignées obtenues est de deux semaines. L'inoculum primaire est représenté par l'extrémité des lignées racinaires non ramifiée d'environ 2 cm. Pour chaque lignée trois boîtes de Pétri sont utilisées (trois répétitions) pour chaque multiplication (**Harfi, 2013**).

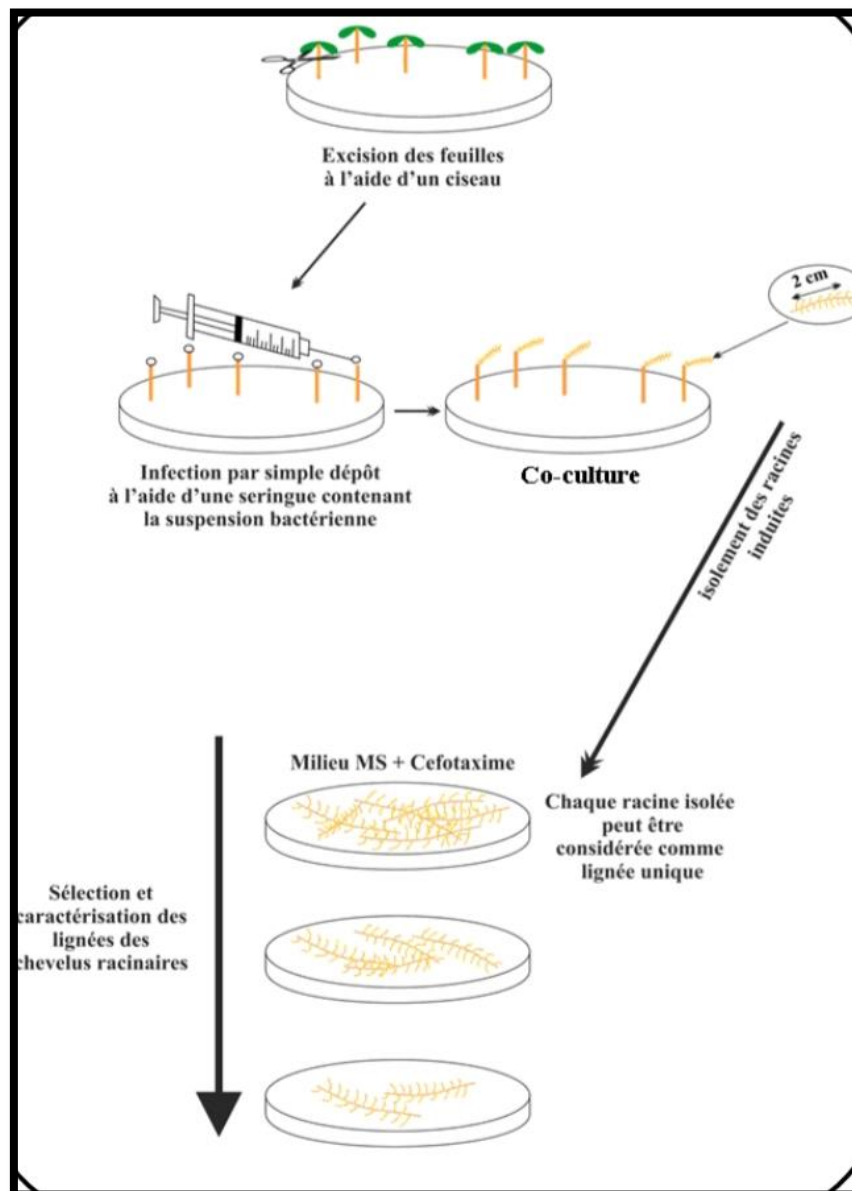


Figure 16 : Méthode de l'infection de la Co-culture et de l'isolement des racines induites

III.5 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 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 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). Trois Erlenmeyers sont utilisés (trois répétitions).

Les CRs 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 CRs exprimé en gramme (**Harfi, 2013**).

III.6 Détermination de la cinétique de la croissance des chevelus racinaires

De l'ensemble des lignées racinaires obtenues, une lignée non callogène caractérisée par une bonne croissance sera retenue 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**).

Troisième partie : Résultats et interprétations

Comme nous n'avons pas terminé notre expérimentation, nous synthétiserons cette partie à partir des résultats des travaux déjà réalisés les années précédentes par plusieurs chercheurs.

I. Germination des graines de *Datura*

Le taux de germination de l'espèce est calculé après 60 jours (deux mois) de culture (**Harfi, 2009**). Les travaux de **Zarouri (2006)** sur l'induction de chevelus racinaires chez *Datura stramonium L.* en vue d'améliorer la production d'alcaloïdes, a enregistré (après deux mois) un taux de germination de 90% avec aucune contamination n'a été enregistrée au cours du développement des vitroplants. **Harfi (2009)** travaillant sur l'induction des chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp a enregistré une valeur de 75,90 %. **Belabasi et Benouaret (2009)** ont enregistré des valeurs variant de 96 % à 98 dans leurs travail sur l'étude de l'essai de l'optimisation de la production d'alcaloïdes à partir de chevelus racinaires de quelque provenances locales de *Datura stramonium L.* en **2011**, presque le même résultat (96%) est obtenu par **Hadjimi** 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* (Killian et Maire) W.L. Gordon.).

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.

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, allant de 37.5 chez la provenance de Saida à 62.5% chez la provenance de Ain-Taya (tableau 8), en revanche, les travaux de **Harfi (2009)** ont montré que le taux d'induction racinaire de *Datura stramonium* a atteint **52,5%**.

Tableau 8 : Variation des taux d'induction racinaire en fonction des provenances de *D. stramonium* (**Belabbassi et Benouaret, 2009**)

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

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*. Pour ce qui est de **Belabbassi et benouaret (2009)**, le temps moyens d'apparition de la première racine vari d'une provenance à une autre, les résultats sont montrés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Variation 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

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 de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp : Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes, 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 12 jours de culture sur milieu MS semis solide, les racines transformées présentent généralement une bonne croissance. Cependant, une partie d'entre elles sont caractérisées par une faible croissance et/ou par la formation de cals. Les racines exprimant ce phénotype ne sont pas sélectionnées (**Khelifi et al., 2009**).

En 2009, **Belabasi et Benouaret** ont sélectionnés 8 lignées racinaires performantes de totale de 64 lignées de départ qui présentent une vitesse de croissance très importante ainsi qu'un développement intéressant, **Harfi (2009)**, a sélectionnés 13 lignées racinaires performantes de quatre espèces de *Datura* (4 lignés de *Datura stramonium*), caractérisées par une bonne croissance sans formation de cals. Ces lignées sont retenues sur la base de leurs vitesse de croissances élevée , leurs degrés de ramification et leur longueur .

Tableau 10 : 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

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, Vitesse moyenne de croissance égale 1.04 cm/jour et une Très bonne ramification avec le PS= 0.205 ± 0.002 g et teneurs élevées en hyoscyamine (8.16 ± 0.613 mg/g M.S.) (Harfi, 2012).

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 CRs est sensiblement le même pour les trois lignées sélectionnées (Figure 16).

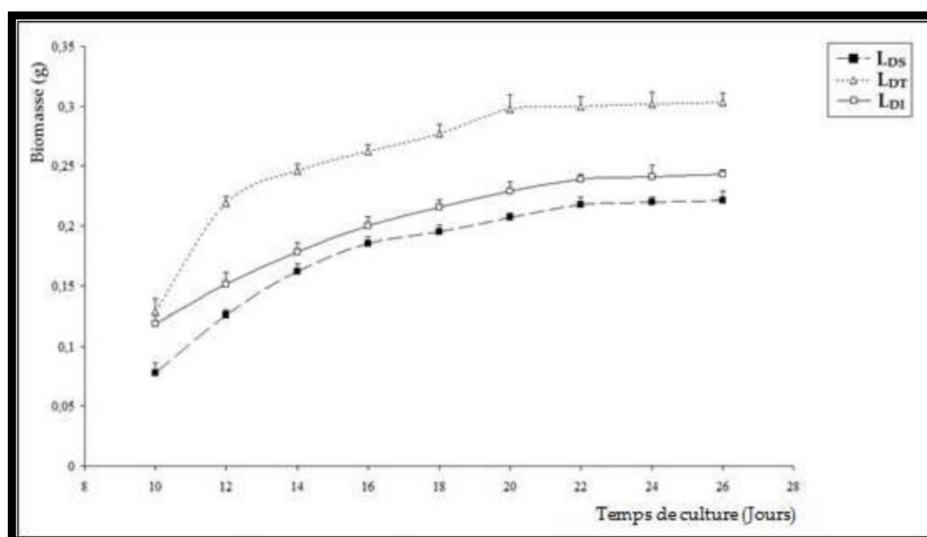


Figure 17 : Cinétique de croissance des CRs (Harfi, 2013).

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 CRs 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 L_{DT} (lignée de *Datura tatula*), et au 22^{ème} jour pour les lignées L_{DS} (lignée de *Datura stramonium*) et L_{DI} (lignée de *Datura innoxia*).

La figure 17 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.

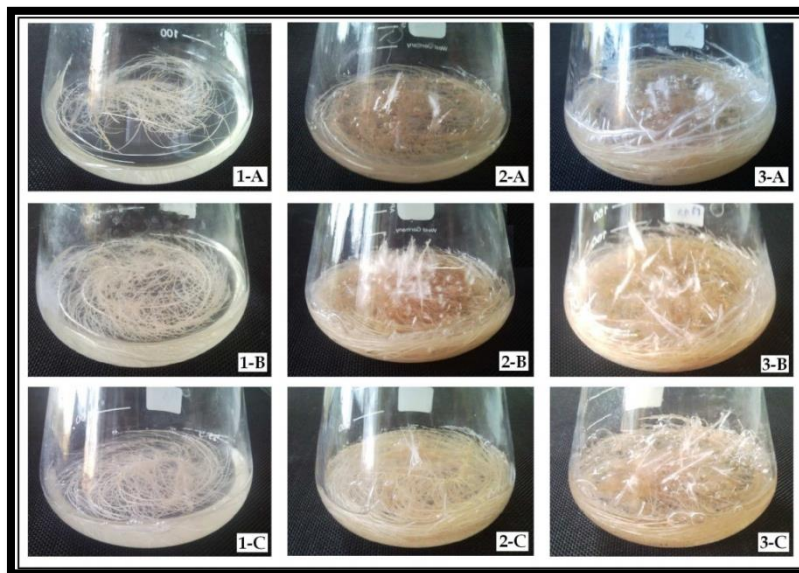


Figure 18 : Biomasse des lignées retenues cultivées dans le milieu B5 liquide ($G.=0.44x$) ;

1 : 10 jours, 2 : 20 jours et 3 : 26 jours de culture. A : L_{DS}, B : L_{DT} et C : L_{DI} (**Harfi, 2013**).

Zerouri (2012) a aussi déterminée la cinétique de croissance des CRS mais ses résultats sont différents de ceux de **Harfi (2013)**, la première phase de cycle de croissance est correspondre \pm aux deux premiers jours de culture et présente une absence ou 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 attend 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).

Conclusion :

D'après la recherche bibliographique, la plante *Datura stramonium* est l'une des plantes médicinales riches en source d'alcaloïdes tropaniques intéressants.

Les chevelus racinaires de *Datura* ; induits par transformation génétique via la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* sont connus par des taux de production d'hyoscyamine et de scopolamine plus intéressants que les racines de plantes. Ces deux molécules ont un intérêt pharmacologique très recherché dans la vie humaine. 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**). Cependant, certains facteurs influencent leur rendement.

L'objectif de ce travail a été la transformation génétique de *Datura stramonium* par *Agrobacterium rhizogenes* en vue de la production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutiques.

Et à cause de coronavirus qui nous empêche à compléter notre travail, nous sommes obligés de collecter les différents résultats des travaux précédents et nous les associons à notre expérimentation.

Références bibliographique

- **Aehle E., Dräger B, 2010.** Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques: An update. *Journal of Chromatography B*, 878, 1391–1406.
- **Alexander J., Benford D., Cockburn A., Cravedi J. P., Dogliotti E., DiDomenico A., Féranandez-Cruz M. L., Furst P., Fink-Gremmels J., Lodovico G. C., Grand J. P., Gzyl J., Heinemeger G., Johansson N., Mutti A., Schlatter J., Van Leluwen R., Van Peteghem C., Verger P, 2008.** Tropane alkaloids from *Datura* sp as undesirable substances in Animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contamination in the food Chain, pp 1-55.
- **Aliasgharpour. M., Hekmet Shoar. H., Hosseyni M. S, 2000.** Stigma of *Datura stramonium* L. (Solanaceae): Histogenesis, morphology and developmental anatomy. *J. Sci. Iran.* 11, N°. 4.
- **Allerberger F., Fretz R., Schmid D., Brueller W., Girsch L., Pichler A.M., Riediger K., Safer M, 2007.** Food poisoning due to Jimson weed mimicking *Bacillus cereus* food intoxication in Austria, 2006, pp557-558.
- **Amdoun R., Khelifi L., Khelifi-Slaoui M., Amroune S., Benyoussef E.H., Thi D.V., Assaf-Ducrocq C. et E. Gontier, 2009.** Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the in vitro biochemical response. *Plant Science.* 177: 81–87.
- **Amdoun R., Khelifi-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.
- **Amdoun R., Khelifi–Slaoui M., Hadjimi G., Amroune S. et Khelifi L, 2007.** Etude des propriétés de croissance et du contenu en hyoscyamine d'une culture de chevelus racinaires et de suspensions cellulaires de *Datura stramonium* L. *Revue Biotechnologies végétales.* 1: 7-18.
- **Amini M., Khosrojerdi H., Afshari R, 2012.** Acute *Datura Stramonium* poisoning in East of Iran - a case series. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, Vol. 2, No. 2, 86-89.
- **Ankenbauer R. G., Nester E.W., (1990).** Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes : structural specificity and activities of monosaccharides. *J Bacteriol.* 172: 6442-6446.
- **Anonymous (2003)** The Wealth of India, National Institute of Science Communication and Information Resources, Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India. Volume 3: D, pp 6-7, 15-18.
- **Arouko H, 2003.** *Datura stramonium*. *Ann . Med. Int.* 154, pp1546-1550.
- **Arouko H., Matray M.D., Braganca C., Mpaka J.P., Chinello L., Castaing F., Bartou C., & Poisot D. 2003 .** L'intoxication volontaire par l'ingestion de *Datura stramonium*. *Ann. Med. Interne*, 2003.154, Hors- Série I, pp : 1 46 -150.
- **Arroo R., Woolley J., Oksman-Caldentey K.M., 2007.** II.3 Henbane, Belladonna, *Datura* and Duboisia. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 61.
- **Attenhofer J.C., Pellikka, P. 2003.** Atropine for inconclusive exercise tests: A beautiful solution or just cosmetics?. *Am Heart J*; 145:938-40.

- **Avery , A.G, S. Satina et J.Rietesema, 1959.** Blakeslee : the genus *Datura* Chronic Botanica , Vol .20 p 1-289.
- **BAIZA A.M., QUIROZ A., RUIZ J.A., MALDONADO-MENDOZAI., LOYOLA-VARGAS V.M., 1998.** Growth patterns and alkaloid accumulation in hairy root and untransformed root cultures of *Datura stramonium*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54: 123–130.
- **BANDYOPADHYAY M., JHA S. TEPFER D., 2007,** Changes in morphological phenotypes and withanolide composition of Ri-transformed roots of *Withania somnifera*. *Plant Cell Reports*, 26:599–609.
- **BANSO A. et ADEYEMO S. , 2006.** Phytochemical screening and antimicrobial assessment of *Abutilon mauritianum*, *Bacopa monnifera* and *Datura stramonium*. Department of Science Laboratory Technology, Nigeria. *BIOKEMISTRI* 18(1):39-44.
- **Barguil Y, 2011.** Etude de trois plantes psychotropes consommées en Nouvelle-Calédonie kava, cannabis et datura Aspects médicaux et médico-légaux. Thèse de docteur en chimie des biomolécules. La Nouvelle-Calédonie.
- **Barguil Y., Mermond S., Kintz P., Villain M., Choblet E., Cirimele V., Cabalion P., Duhet D., Charlot J. Y. 2006.** L'abus de Daturas et de Kava en Nouvelle Calédonie : une pratique inquiétante. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. XVIII, n° 1.
- **Beauquesne B.L., Pinkas M., Torck M., Trotin F, 1980.** Plantes médicinales des régions tempérées. Edition maloine, Paris, pp 286-289.
- **Beaver M., Gavin J., 1998.** Treatment of acute anticholinergic poisoning with physostigmine. *Am J Emerg Med* 16; 505-507.
- **BELABBASSI O. et BENOUARET R. , 2009 ,** Essai d'optimisation de la production d'alcaloïdes à partir de chevelus racinaires de quelques provenances locales de *Datura stramonium*. d'ingénieur ,ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH –ALGER.
- **Beliard E, Met C. & Morel-Krause E, 2002.** Protection alternative des cultures ornementales sous serre. *Phytoma. La Défense des Végétaux*, n°546, p 42.
- **Berkov S., Doncheva T., Philipov S. & Alexandrov K, 2005.** Ontogenetic variation of the tropane alkaloids in *Datura stramonium*. *Biochemical Systematic and Ecology*, 33 : 1017-1029.
- **Berkov.S. & Philipov.S, 2002-** Alkaloid Production in Diploid and Autotetraploid Plants of *Datura stramonium*. *Pharmaceutical Biology*, 40 (8) : 617-621.
- **Bhattacharjee SK, 2004.** A hand book of medicinal plants, (4th Ed.), The Diamond Printing Press, India, pp 125.
- **Blakeslee A F., Belling J. Farnham M E. & Bergner A. D., 1922.** A haploid mutant in the Jamson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55, 646-647.
- **Bock B. 2012.** *Datura stramonium* L. *Tela Botanica* ; Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France BDNFF v4.02.
- **BOITEL-CONTI M., LABERCHE J.C., LANOUE A., DUCROCQ C., SANGWAN-Bonnier G., Douin R, 1990.** La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier. Edition bellin, Paris, pp 817-818.
- **Boris M, 2001.** Intoxication des animaux domestiques par les plantes de la famille des Solanacées.thèse de Doctorat.
- **Bourgaud F., Bouque V., Gontier E. and Guckert A, 1997.** Hairy root cultures for the production of secondary metabolites. *Ag Biotech News Inf.* 9 (9): 205–208.
- **Bourgaud F., Gravot A., Milesi S. and Gontier E, 2001.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science.* 161: 839–851.
- **Bouzar H., 1983.** A servey of Agrobacterium strains associated with Georgia pecan trees and an immunological stady of the bacterium. Thèse Master of Science. Oregan state university. USA. 67 P.

- **Bouzidi A., Mahdeb N., Kara N., 2011.** Acute toxicity study of alkaloids of *Datura stramonium* seeds in rat. Research opinions in animal & veterinary sciences 1(6), xxx.
- **Bremness L., 2005.** Plantes aromatiques et médicinales. Edition Larousse, Paris, p 246
- **Brooks J.K and Reynolds M.A., 2007.** Ethnobotanical Tattooing of the Gingival. American Dental Association, 138, 1097-1101.
- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. (2e éd). Paris: Lavoisier; Cachan : (Éd). Médicales internationales.
- **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Paris, pp. 647-673.
- **Bruneton J., 2001.** Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. (2 èmè éd). Tec et Doc. Paris , 481-512.
- **Bruneton J., 2005.** Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. 3ème édition. Edition tec & doc, Paris, pp 525-537.
- **Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4e éd. Paris: Lavoisier ; Cachan : Éd. médicales internationales;
- **Caligiani A., Palla G., Bonzanini F., Bianchi A., Bruni R., 2011.** A validated GC–MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods. Food Chemistry 127, 204–209.
- **CASSE. D., 1990.** Utilisation d'*Agrobacterium* pour l'obtention de plantes transgéniques. Cinquantenaire des cultures *in vitro*. Les colloques de l'INRA n°51, Versailles, Ed. clair doré, Paris : 219-230.
- **Cazin F, Cazin H, 1997.** Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes. 3 e éd. Mane: Edition de l'Envol;
- **Chan K, 2002 .** Jimson Weed poisoning – A Case Report. The Permanente journal; 6 : 28-30
Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20: 101-153.
- **Chilton M.D, 1983.** L'introduction de gènes étrangers dans les plantes. Pour la science, vol.70. p.p: 89-99.
- **Chollet S., Papet Y., Mura P., Brunet B. 2010.** Détermination des teneurs en atropine et scopolamine de différentes espèces sauvages et ornementales du genre *Datura*. Ann Toxicol Anal; 22(4): 173-179.
- **Chriqui D, 1998.** Biotechnologies végétales : Génie génétique. Laboratoire CEMV – Université P. & M. Curie, Paris VI, 84 P.
- **Clark J. D, 2005.** The Roadside High: Jimson Weed Toxicity. Air Medical Journal
- **Cohen Y, 1990.** Pharmacologie. 3ème édition. Masson, Paris, pp 15-18.
Contribution à l'étude d'Aptitude Pédagogique de l'Ecole Normale « C.A.P.EN » 24:6.
- **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.
- **Dapkevicius, A ., Venskutonis, R ., Van Beek, T ., & Linszen, J. (1998).** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. Journal of Science Food and Agriculture, 77(1), 140-146.
- **Desachy A., François B., Vignon P., Roustan J., Gay R, 1997.** Une intoxication rare au *Datura stramonium* A propos de deux cas. Réan Urg; 6 (1) ; 51-53.
- **Dessanges J. F , 2001.** A history of nebulization ,journal of aerosol medicin . p 65-71.
- **Devi M., Bawari M., Paul S., Sharma G, 2011.** Neurotoxic and Medicinal Properties of *Datura stramonium* L. Journal of Science & 1; 139-144.°Technology Vol. 7 N.

- **Dhakulkar S., Ganapathi T.R. Bhargava S. Bapat V.A., 2005.** Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. And production of verbascoside in hairy root. *Plant science*, n. 169, p.p. : 812-818.
- **DICOSMO F. et MISAWA M., 1995.** Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13 (3): 425-45.
- **Diether S., Schaeffel F., Lambrou G. N., Fritsch C., Trendelenburg A, 2007.** Effects of intravitreally and intraperitoneally injected atropine on two types of experimental myopia in chicken. *Experimental Eye Research* 84, 266-274.
- **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 (Tafilaleit). *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.
- **El Bazaoui A., Bellimam A. , Soulaymani A., 2011.** Nine new tropane alkaloids from *Datura stramonium* L. identified by GC/MS. *Journal home page : www.elsevier.com / locate / fitote.* *Fitoterapia* 82 . 193–197.
- **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.
- **ERCAN A.G. Et TAŞKIN M., 1999.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root formation in some *Rubia tinctorum* L. population Grown in Turkey .*Tr.J. of Botany.* 23: 373-377.
- **Ertekin V., Selimoglu M. A., Altinkaynak S, 2005.** A Combination of unusual presentation of *Datura stramonium* intoxication in a child: rhabdomyolysis and fulminant hepatitis. *Journal of Emergency Medicine*, Vol. 28, No. 2, pp. 227–230.
- **Evans D.E., Coleman G.O.D et Kearns A, 2003.** *Plant cell culture* . Ed : BIOS Scientific publishers , p 194.
- **Fabre R., Truhaut R, 1961.** Précis de toxicologie. Tome 2. Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, pp 379-454.
- **Flesch F, 2005.** Intoxications d'origine végétale : Plant poisoning. *EMC-Médecine* 2, pp 532–546
- **FLORES H. E. et MEDINA-BOLIVAR F., 1995,** Root culture and plant natural products: « unearthing » the hidden half of plant metabolism. *Plant tissue culture and biotechnology*, 1 (2): 59-74.
- **Flores L.H.E., Vivanco J.M et Loyola-Vargas V.M., 1999.** Radical biochemistry : the biology of root-specific metabolism . *Trends in Plant Science*, 4,pp. 220-226.
- **Gadzovska S., Maury S., Hano C., Lamblin F., Spasenoski M., Joseph C., Hagège D., 2004.** Influence de different éliciteurs sur la production de metabolites secondaires de divers explants d'*Hespericum perforatum* L. *Culture in vitro*. Acte du 17 ème colloque biotechnologique. France, 72P.
- **Gaillard Y., Pepin G, 1999.** Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography– (tandem) mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 733, 181–229.
- **Gaire B. P , 2008.** Monographs on *Datura stramonium* L. The School of Pharmaceutical and Biomedical Sciences Pokhara University, P. O. Box 427, Lekhnath, Kaski, NEPAL.
- **Gaire B. P , Lalita S ,2013** .a review on the pharmacological and toxicological aspects of *Datura stramonium* L. *Journal of Integrative Medicine* March 2013, Vol.11, No.2 <http://www.jcimjournal.com/jim>.

- **GAMBORG O.L , 1970**, Effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension cultures. *Plant Physiology*, 45: 372–375
- **Garnier G ,1961**. Ressources médicinales de la flore française Tome 2. Paris: Vigot;
- **Geeta R. & Gharaibeh W, 2007** . Historical evidence for a pre-Columbian presence of *Datura* in the Old World and implications for a first millennium transfer from the New World », *J. Biosci.*, vol. 32, n o 7, p. 1227-1244.
- **Ghedjati N, 2014**. Toxicité aigue et subaigüe des alcaloïdes naturels et synthétiques des graines du *Datura stramonium*, Thèse de Magister . Université Ferhat Abbas Sétif 1 , Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- **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.
- **Gildemeister, E ., & Hoffmann, F. 1919**. Les Miltitz. Edition Challamel, (1941). 634-635.huiles essentielles. (2 ème éd). Tome III. (Ed).
- **Giri A et Narasu M.L., 2000**. Transgenic hairy roots : recent trends and applications . *biotechnology advances*, 18(1), pp. 1-22.
- **GONTIER E., SANGWAN B.S., BARBOTIN J. N., 1994**, Effects of calcium, alginate, and calcium-alginate immobilization on growth and tropane alkaloid levels of a stable suspension cell line of *Datura innoxia* Mill. *Plant Cell Reports*, 13:533-536.
- **Goullé J., Droy J., Leroy J, 2000**. Réponses analytiques aux syndromes cholinergiques et anticholinergiques. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. 12.
- **Goullé J.P, Pépin G., Toulet V. D., Lacroix C, 2004**. Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Annales de Toxicologie Analytique*, vol. 16, n° 1.
- **GrevozG. 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., Cosson L., Henry M, 1985**. Abrégé de phyto-chimie. Masson, Paris, pp 175-191.
- **Guillon S., Termouillaux – 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) W. L. Gordon.Mémoire en vu de l’obtention du diplôme de magistère en biotechnologies appliquées à la protection des plantes ; ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH – ALGER-.
- **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. , 2009**. Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Datura* sp : Essai d’optimisation de la production d’alcaloïdes. Thèse de magistère , Institut National Agronomique El Harrach – Alger.
- **Harfi .B , 2013**. Etablissement d’un procédé biotechnologique pour la production de l’hyoscuamine chez *Datura* sp. ENSA-ALGER. 79p.

- **He C.Y., Hsiang T., Wolyn D.J., 2002.** Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol.*, vol. 51, p.p. : 225–230.
- **HILTON M.G. RHODES M.J.C., 1990,** Growth and hyoscyamine production of 'hairy root' cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33: 132-138.
- **Houmani Z., Cosson L., Corbineau F. et Come D, 1994.** Etude de la teneur en hyoscyamine et scopolamine d'une population sauvage de *Datura stramonium* L. en Algérie. *Acta Bot. Gallica*. 141 (1) : 61-66.
- **Houmani, Z, 1999.** Quelques plantes algériennes à alcaloïdes tropaniques, effet du stress salin et hydrique sur la production d'alcaloïdes, variation de leurs teneurs au cours du stockage. Thèse de Doctorat. INA El-harrach, Algérie, 124p.
- **Hutcheson, S. W. (1999).** The hrp Cluster of *Pseudomonas syringae*: aPathogenicity Island Encoding a Type III Protein Translocation Complex?. In *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements* (pp. 309-329). American Society of Microbiology.
- **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.
- **Iranbakhsh, A. R., Oshagi, M. A., & Ebadi, M. (2007).** Growth and production optimization of tropane alkaloids in *Datura stramonium* cell suspension culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(8), 1236-1242.
- **JABER ALI, 2017.** Thèse de doctorat Chimie Analytique. Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications.p 34.
- **Jakabová S., Vinczec L., Farkasd Á., Kilár F., Borosf B., Felinger A, 2012.** Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography–mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A*, 1232; 295– 301.
- **Javaid A., Shafique S et Shafique S, 2008.** Herbicidal activity of *Datura metel* L. Against *Phalaris minor* Retz. *Pakistan Journal of Weed Science Research* , 14 (3-4), pp.209-220.
- **Jha T.B et Ghosh B., 2005.** *Plant tissue culture : basic and applied*. 1st Ed. Universités Press , New Delhi, p 206.
- **Jin S., Song Y., Pan S., Nester E.W., (1993).**“Characterization of a *vir* G mutation that confers constitutive virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*.” *Mol. Microbiol.* 7 : 555-562.
- **Katzung B. G, 1996.** *pharmacologie fondamentale et clinique*. Piccin. pp 125-132.
- **Khare, 2003.** *Indian Herbal Remedies : Rational Western Therapy, Ayurvedic, and Other Traditional Usage*, Botany, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co.,
- **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.
- **Khelifi-Slaoui M., Khelifi L., Rezine R., Amdoun R., Morsli A. et Amroune S., 2005.** Embryons somatiques et bourgeons néoformés induits sur explants issues de vitrosemis de *Datura stramonium* L.. *Biotechnologies végétales*. Ed. Khelifi. Alger, no. 0, p.p.: 33-36.
- **Kim, N ., & Lee, D. (2002).** Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *lavandula* species by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of chromatography*, 98, 31-47.

- **Lahners K., Byrne M.C., Chilton M.D., 1984.** T-DNA fragments of hairy root plasmid pRi8196 are distantly related to octopine and nopaline Ti plasmid T-DNA. *Plasmid*, vol. 11, p.p. : 130-140.
- **Lambert C., Thomas G., Leger D., Pamboukdjian N., Tepfer D., 1988.** Utilisation de la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* pour améliorer la rhizogénése d'arbres fruitiers. 8ième colloque sur les recherches fruitières-Bordeaux Ed. INRA-CTIFL, p.p. : 73 - 84.
- **LEE K.T., YAMAKAWA T., KODAMA T., SHIMOMURA K., 1998b,** effects of chemicals
- **Legrand G, 1993.** Manuel de préparateur en Pharmacie. Masson, Paris.
- **Levitt, J., Lovett J.V., 1984.** Activity of allelochemicals of *Datura stramonium* L. (Thorn-apple) in contrasting soil types, *Plant and soil*, 79: 181-189
- **Li L.-n., Ji, M.-s., et Su, Z. y, 2006.** Research advances in use of the agricultural fungicide *Sophora flavescens*. *PESTICIDES-SHENYANG-* 45, 581.
- **LIANG Y., AOYAMA T. et OKA A., 1998,** Structural characterization of the *virB* operon hairy-root-inducing plasmid A4. *DNA Research*, 5: 85-93.
- **Lièvre K, 2004.** Modification de la composition en molécules pharmaceutiques (furocoumarines) de la Rue officinale (*Rutagraveolens*) par transformation génétique. Thèse Doctorat de l'INPL. p. 197
- **Lin Y.G., Chen P.H., Chang F.Y., Wu L.T., Liao K.Y., Wu T.C, 2011.** Delirium due to Scopolamine Patch in a 4-Year-Old Boy. *J Formos Med Assoc*; 110 (3):208-211.
- **LINSMAIER, E.M. et SKOOG, F., 1965 .**Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 18: 100-127.
- **LLOYD G., MCCOWN B., 1980,** Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagation Society Proceeding*, 30: 421–427.
- **Lovett J.V. , Levitt J et Duffield A.M. , 2006 .** Allelopathic potential of *Datura stramonium* L. (Thorn apple). *Weed Research*, 21 (3-4), pp.165-170 .
- **Mace, E.S., Gebhardt, C.G., & Lester, R.N., 1999 .** AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae (Solanaceae). *Theor. Appl. Genet.* 99, 634 641.
- **Maibam RD, Meenakshi B, Paul SB, Sharma GD,2011.** Neurotoxic and Medicinal Properties of *Datura stramonium* L. *Assam University Journal of Science & Technology: Biological and Environmental Sciences.*;7(1):139–44.
- **Mairura, F.S. & Setshogo, M.P, 2008.** *Datura stramonium* L. In : G.H. Schmelzer & A. Gurib-Fakim (eds). *Prota 11(1) : Medicinal plants/Plantes médicinales 1.* [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Pays Bas.
- **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.
- **MARTEL C ,2012.** *Datura stramonium*, une plante hallucinogène émergente en France. Thèse d'état de docteur en pharmacie ,Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille. p33.
- **Marwat S., Urrehman F., Khan S., 2005.** Germination of seeds of *Datura stramonium* L. Under different condition (Temperature and Soil). 21: 45-49.
- **Miraldi E., Mastib A., Ferria S., Comparinib I, 2001.** Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* 72; 644-648
- **Mirzamatov R. T., Malikov V. M., Lutfullin K. L., Yunusov S. Y., Soedin Khim P, 1972.** Dynamics of the accumulation of alkaloids in *Datuar stramonium* L., pp 493.
- **Moharrami, F., Hosseini, B. B., Sharafi, A., and Farjaminezhad, M. (2017).** Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture
- **Molino P , 2005.** A Guide to medicinal Plants In North Africa (Malaga, Spain).P ..

- **Montcriol A., Kenane N., Delort 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, pp 810–813.
- **Morsli A., 2013.** Caractérisation de la diversité génétique de quelques espèces de *Datura* L. en Algérie., thèse de doctorat, Université Mouloud Maaméri de Tizi Ouzou, p: 5.
- **Moulin M., 1998.** Pharmacologie. Masson, Paris, pp 249-251.
- **Mountain L., 1987.** Jimsonweed, *Datura stramonium* L. Solanaceae. *Regulatory horticulture weed circular*. Vol. 13, No.1. (a6).
- **Moussous A., 2019.** Effet de l'élicitation sur la croissance et la production d'alcaloïdes tropaniques des chevelus racinaires de *Datura* sp. Thèse DOCTORAT 3ème cycle. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach – Alger.
- **MOYANO E., FORNALE S., PALAZON J., CUSIDO R.M., BONFILL M., MORALES C., PIÑOL M.T., 1999,** Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry*, 52: 1287-1292.
- **Mukundan U., Rai A., Dawda H., Ratnaparkhi S., Bhide V., 1998.** Secondary metabolites in *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformed root cultures. *Plant Tissue Culture and Molecular Biology Applications and Prospects*, New Delhi House, p.p. : 302 – 333.
- **Murashige, T., and Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15, 473-497.
- **Namdeo A.G., 2007.** Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Phcog. Rev*, vol. 1, p.p.: 69-79.
- **Nayyar M. S., Muhammad A. H., Muhammad I. M., Muhammad A.A., Rafia R., 2020.** Medicinal Plants of South Asia, chapter 16, , Pages 207-216
- **NISHIYAMA Y. ET YAMAKAWA T., 2004,** Effect of medium composition on the production of anthocyanins by hairy root cultures of *Ipomoea batatas*. *Plant Biotechnology*, 21(5): 411–414.
- **NORREEL B.S., 2000,** Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 131–137.
- **NUSSBAUMER P., KAPÉTANIDIS I., CHRISTEN P., 1998,** Hairy roots of *Datura candida* x *D. aurea*: effect of culture medium composition on growth and alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports*, 17: 405–409.
- **OKSMAN-CALDENTY K.M., SEVON N., VANHALA L., HILTUNEN R., 1994.** Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 38: 263-272.
on alkaloid production by transformed roots of Belladonna. *Phytochemistry*, 49 (8): 2343-2347.
- **Ono, N. N., and Tian, L., 2011.** The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. *Plant Science* 180, 439-446
- **Palazon J., Navarro-Ocana A., Hernandez-Vazquez L et Mirijalili M.H., 2008.** Application of metabolic engineering to the production of scopolamine. *Molecules*, 13, pp. 1722-1742.
- **Paris M., Hurabielle M., 1981.** Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome 1. Masson, Paris, pp101-284.
- **Paris RR. et Moyses H., 2005.** Précis de Matière Médicale Tome 3. 2e éd. Paris: Masson; 1971.
- **PARR A.J., PEERLESS A.C.J., HAMILL J.D., WALTON N.J., ROBINS R.J., RHODES M.J.C., 1988,** Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*, 7: 309-312.

- **Paul, I., Edith, Y., Pierre, V., Annie, B., & Jacqueline, B. (2001).** La rouse, encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparations, soins.(2nd ed). l'édition originale en langue française, Paris, 335.
- **Perrotta DM., Nickey LN, Raid M., Caraccio T., Pharm D., Mofenson HC, Waters C, Morse D., Osorio AM., Hoshiko S., Rutherford GW, 1995.** Jimson Weed Poisoning Texas, New York, and California, 1994. MMWR. Vol. 44 / No. 3.
- **Peter A, 1983.** A multidisciplinary overview of intoxicating enema rituals in the western hemisphere. Journal of Ethnopharmacology, 9 ; 129-166.
- **Pretorius E., Marx J. 2006.** *Datura stramonium* in asthma treatment and possible effects on prenatal development. Environmental Toxicology and Pharmacology 21, 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.
- **RADMAN R., SAEZ T., BUCKE C., KESHAVARZ T., 2003,** Elicitation of plant and microbial systems. Biotechnology and Applied Biochemistry, 37: 91-102.
- **RAKOTOARIVELO H ,2011.** Contribution à l'étude phytochimique de *Datura*.
- **Ravishankar G.A., Rao S.R., 2002.** Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20: 101–153.
- **Reichl, B.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.
- **Ricard F., Abe E., Mayer C. D., Charlier P., Grandmaison G., Alvarez J.C, 2012.** Measurement of atropine and scopolamine in hair by LC–MS/MS after *Datura stramonium* chronic exposure. Forensic Science International 223, 256-260.
- **Riker, A.J., Banfield, W.M. et Wright, W.H. 1930.** Studies on infectious hairy root of nursery apple trees, J. Agr. Res., , vol. 41, pp. 507–540
- **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.
- **Roblot F., Montaz L., Delcoustall M., Gaboriaul E., Chavagnat JJ., Morichaudl G., Pourrat0., Scepil M., Pattel D, 1995.** Intoxication par *Datura stramonium*: le diagnostic est clinique, le traitement est symptomatique. Rev Med Interne16, pp187-190.
- **Rodrigo G.J., Rodrigo C, 2002.** The role of anticholinergics in acute asthma treatment. CHEST, 121, 6.
- **Rolard B, 2002.** Pollution chimique et radioactive : les plantes au secours de l'homme. In : <http://www.perso.club-internet.fr/phyto200/pollution.html>
- **Roldan G., Cobos-Zapian G., Quirarte G. L., Prado-Alcala R. A, 2001.** Dose- and time-dependent scopolamine-induced recovery of an inhibitory avoidance response after its extinction in rats. Behavioural Brain Research 121, 173–179.
- **Sahli F et Gadiri M.N, (2015).** Etude de la sensibilité de *Zygophyllum album* L. aux souches de *Agrobacterium rhizogenes* en vue d'induire, par co-culture, le chevelu racinaire (Hairy root)
- **Salen P., Shih R., Sierzenski P., Reed J 2003.** Effect of Physostigmine and Gastric Lavage in a *Datura stramonium* -Induced Anticholinergic Poisoning Epidemic. Am. J. Emerg. Med. 21:316-317.
- **Sasson A, 1991.** Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological economic aspects. Option méditerranées – série séminaire. 14 : 59-74.
- **Ščepanovic M., Novak N., Bariš K. ; Ostojic Z., Galzina N et Goršic M., 2008.** Allelopathic effect of two weed species, *Abutilon theophrasti* Med. and *Datura stramonium* L. on germination and early growth of corn. Agronomy journal, 69 (6), pp.459-472.

- **Schauenberg P et Paris F, 1997.** Guide des plantes médicinales. Ed. Delachaux et Niestlé, Paris, 396 P.
- **Schmelzer G.H., & Gurib-Fakim A., 2008 .** Plantes médicinales 1, Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11 (1), Prota, 868p.
- **Schorderet et collaborateurs, 1998.** Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Edition slatkine, Genève, pp 3-87
- **SEVON N., OKSMAN-CALDENTY K.M., 2002,** *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation: Root cultures as source of alkaloids. *Planta Medica*, 68: 859-868.
- **Shi M. , Pan Liao , Shivraj H. N ., Milen I. Georgiev , et Guoyin Ka, 2020.** Biotechnological Exploration of Transformed Root Culture for Value-Added Products, Review. Trends in Biotechnology.
- **Shimomura K., Sauerwein M. and Ishimaru K, 1991.** Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of solanaceous plants. *Phytochemistry*, (30) 7: 2275-2278.
- **SIKULI N.N. ET DEMEYER K., 1997,** Influence of the ion-composition of the medium on alkaloid production by "hairy roots" of *Datura stramonium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 261-267.
- **Site Gerbeaud https://www.gerbeaud.com/jardin/jardinage_nature/lin-pomme-de-terre-doryphore.php**
- **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 I , 2008.** Production of secondary metabolites using plant cell culture .*Adv Biochem Eng Biotechnol . P 200-211.*
- **Spichiger R.E., Savolainen V. V., Figeat M., Jeanmonod D., Perret M. 2002.** Botanique systématique des plantes à fleurs. 3^{ème} 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*, N° 27, 29 – 43.
- **Stéphan. 2002.** Les antimuscariniques. Chapitre 18 les antagonistes muscariniques: l'atropine. Module de Pharmacologie Générale DCEM1. Strasbourg.
- **Symon D. & Haegi L. A. R., 1991 .** *Datura* (Solanaceae) is a new world genus. *Solanaceae III*, Royal Bot. Gard. Kew and the Linnean Society of London, 197-210.
- **TAO J. Et LI L., 2006.** Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African journal of botany*. 72: 211-216.
- **Tikhomiroff C., 2001.** Mécanismes de transformation de plantes dicotylédones par *Agrobacterium tumefaciens*.
- **Trabut A., 1935 .** Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique, Algiers, Algeria, Collection du Centenaire de l'Algérie. 355 p.
- **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.
- **VAN DER PLANK J. E. et O'CONNOR F. C., 1952,** *Datura ferox* : A test plant for potato virus Y. *The American Potato Journal*, 29: 125-126.
- **Vasconsuelo A., Boland R., 2007.** Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sciences*, 172, p.p: 861-875.
- **Veena V., Taylor C.G., 2007.** *Agrobacterium rhizogenes* : recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, vol. 43, p.p. : 383 – 403.

- **Veersham C, 2004.** In Elicitation: Medicinal Plant Biotechnology, C.B.S. Publisher, India, p.p. : 270-293.
- **VERPOORTE R., CONTIN A., MEMELINK J., 2002.** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1: 13–25.
- **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.
- **Vincent J.M., 1970.** Manual for the practical study of the root nodule bacteria. Ed. IBP. P. 164.
- **Wao, A. A., Khare, S., and Ganguly, S, 2014.** Evaluation of Phytoremediation Potential of *Datura innoxia* for Heavy Metals in an Industrially Polluted Area in Bhopal, India. *Evaluation* 2, 3.
- **Weaver, S.E., Dirks, V.A. & Warwick, S.I. (1985).** Variation and climatic adaptation in Northern populations of *Datura stramonium*. *Can. J. Bot.*, 63 :1303-1308.
- **WILLIAMS G.R.C., DORAN P.M., 1999,** Hydrodynamic boundary layers and oxygen requirements in hairy root cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 64 (6):729-740.
- **Xiang X.H., Wang H.L., Wu W.R., Guo Y., Cao D.Y., Wang H.S., Zhao Y. 2006.** Ethological analysis of scopolamine treatment or pretreatment in morphine dependent rats. *Physiology & Behavior* 88, 183-190.
- **YEOMAN M.M., YEOMAN C.L., 1996.** manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*, 134: 553 – 569.
- **YU S., KWOK K.H., DORAN P.M., 1996,** Effect of sucrose, exogenous product concentration, and other culture conditions on growth and steroidal alkaloid production by *Solanum aviculare* hairy roots. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 238-243.
- **ZAROURI B, 2006.** Induction de chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* sur explants de *Datura stramonium* L. en vue d'améliorer la production d'alcaloïdes. Thèse d'ingénieur, Institut National Agronomique El Harrach – Alger.
- **ZAROURI B, 2012.** Induction de chevelus racinaires chez trois espèces de *Datura*, sélection de lignées performantes pour la production d'alcaloïdes . Thèse de magistère , Institut National supérieure Agronomique El Harrach – Alger .
- **Zenk H., Juenger M, 2007.** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry* 68; 2757-2772.
- **ZHI-BI. H et MIND. ,2006.** Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *Journal of integrative plant biology* 48(2): 121-127.
- **Zhi-yun Z., An-ming L., D'Arcy W. 1994.** Solanaceae. *Flora of China* 17: 300–332.
- **Zrýd J.P, 1988.** Culture in vitro et production de métabolites secondaires. In *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux, fondement théoriques et utilisations pratiques.* Ed. Press polytechniques Romandes, première édition, Lausanne, 308 p.