



HAL
open science

Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol; impact des facteurs biotiques et abiotiques

Thi Dao Vu

► **To cite this version:**

Thi Dao Vu. Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol; impact des facteurs biotiques et abiotiques. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008. Français. NNT : 2008INPL029N . tel-01753048

HAL Id: tel-01753048

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01753048v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources
Procédés Produits Environnement
INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE ET DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'INPL
en Sciences Agronomiques
Présentée et soutenue publiquement par

VU Thi Dao

Le 04 Juillet 2008

**Effets de l'environnement sur la croissance et l'accumulation
de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en
conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.**

Directeur de thèse : **Prof. GONTIER Eric**

Composition du jury :

Mme. LAURAIN-MATTAR Dominique : Prof. à la Faculté de pharmacie, Nancy	Rapporteur
Mme. BOITEL-CONTI Michèle : MDC-HDR à l'UPJV d'Amiens	Rapporteur
M. GUCKERT Armand : Prof. émérite à l'ENSAIA-INPL de Nancy	Président
M. SCHALLER Hubert : Chargé de Recherche, CNRS-IBMP de Strasbourg	Examinateur
M. BOURGAUD Frédéric : Prof. à l'ENSAIA-INPL de Nancy	Examinateur
M. GONTIER Eric : Prof. à l'Université de Picardie Jules Verne d'Amiens	Examinateur

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire UMR Agronomie et Environnement (LAE)-INRA/INPL, de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires – Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy et au laboratoire Androgenèse et Biotechnologie (AEB) de l'Université Picardie et Jules Verne, Amiens.

Avant de présenter ce mémoire, j'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

En premier lieu, je voudrais dire combien je suis particulièrement reconnaissante au Prof. Eric GONTIER, mon directeur de thèse, de m'avoir accordé sa confiance en m'acceptant pour travailler sur ce sujet avec lui. Il a suivi mes travaux avec intérêt tout en me prodiguant des conseils toujours justes. Et il a su me redonner courage et aider à traverser des moments difficiles et des instants de doute. Je tiens tout particulièrement à le remercier profondément pour son aide appréciable, sa gentillesse, sa grande disponibilité et sa compréhension. Je le remercie également pour m'être venu en aide en acceptant de financer les derniers mois de thèse.

Je remercie monsieur Sylvain PLANTUREUX, Prof. et directeur de LAE à l'ENSAIA et madame Brigitte SANGWAN-NORREEL, Prof. et directeur de AEB à l'UPJV, qui m'ont accueillie dans leurs équipes de recherche.

Je remercie vivement monsieur Prof. Armand GUCKERT et monsieur Prof. Frédéric BOURGAUD à l'ENSAIA/INPL, les co-directeurs de ma thèse, qui m'ont aidé à prendre les bonnes directions et m'ont conseillé et encouragé tout au long de la thèse.

Je tiens à remercier Mme Prof. Dominique LAURAIN-MATTAR et Mme MDC-HDR BOITEL-CONTI Michèle qui ont bien voulu accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs de thèse. J'exprime aussi ma profonde reconnaissance aux professeurs Armand GUCKERT, Hubert SCHALLER, Frédéric BOURGAUD et Eric GONTIER, membres du jury de thèse.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Alain HEHN qui m'a guidée dans le contrôle de l'état transgénique du matériel végétal. Avec sa disponibilité, sa patience et sa connaissance du monde de la biologie moléculaire, il m'a aidée à comprendre les enjeux et difficultés de ce travail de recherche.

Je souhaite adresser tous mes remerciements à Mme M. BOITEL-CONTI, M. J-C. LABERCHE, M. C. ROBIN et M. E. NAVA SAUCEDO, qui ont toujours trouvé le temps pour mener avec moi des discussions très enrichissantes.

Mes remerciements s'adressent également à mesdames : C. LARRIERE, T. OLIVIER, M. POIRET, M. CALLIER, C. RAYON et à messieurs : D. THIERY, G. VASSEUR. Ils ont fait preuve d'efficacité et de gentillesse pour traiter nos demandes malgré leur charge de travail.

Mes remerciements vont aussi aux doctorants de LAE : F. BITEAU, C. BENARD, R. KOLLER, S. DOERPER, R. LARBAT, B. CLEGUE, M. CREGUT et l'ingénieur B. MIGNARD pour leurs aides, leur dévouement et leur gentillesse tout au long de ma thèse.

Je tiens également à remercier les doctorants de AEB : N. KHODOROVA pour son aide dans le traitement des photos et qui m'a offert son amitié ; S. LEHRAIKI, H. AL BALKHI, B. MENDOU et R. NASRI pour leur aide durant les deux dernières années ; les post-doctorants : TLM TRAN, Y. HUET pour leurs conseils et aides durant mes dernières expériences, et enfin, C. JOUSSE pour ses aides et relectures de mon document.

Ma gratitude va aussi à tous les stagiaires, techniciens, chercheurs et enseignants-chercheurs appartenant aux laboratoires de Nancy et d'Amiens pour leur accueil sympathique ; qui m'ont fait part de leur passion de recherche, et n'ont pas hésité à consacrer du temps à répondre mes questions.

Mes remerciements s'adressent aux docteurs : H. DE BON (CIRAD de Montpellier) pour l'aide qu'il m'a apporté pour ma venue en France et J. LE BOT pour m'avoir initié à la recherche au sein d'un laboratoire français à l'unité Plantes et Systèmes de Cultures Horticoles de l'INRA d'Avignon ; aux messieurs directeurs : J-F LEFEVRE - responsable de plateforme régionale de Picardie pour son autorisation de travailler dans son local, J-P FEVRE de la société de PAT SAT et R. SANGWAN de CNRS qui m'ont encouragé au cours de ma thèse.

Cette étude n'aurait pu se réaliser sans l'apport du gouvernement de mon pays le Viet Nam qui m'a alloué une bourse d'étude, et plus particulièrement l'ensemble du personnel du Projet 322. Qu'il retrouve ici toute ma reconnaissance et mes plus vifs remerciements.

Je ne terminerai pas mes remerciements sans une pensée pour ma famille, et ma petite Dieu Huong, à qui je dois un soutien tant moral qu'affectif et qui ont su m'entourer tout au long de ce travail, un soutien qui va bien au-delà de ce que je pourrais exprimer.

Encore merci à tous !

LEXIQUE/ABREVIATION

%MS : pourcentage de matière sèche

°C : degré Celsius

μM : micromolaire

μS/cm ou mS/cm : microSiemens/cm ou milliSiemens/cm

A.r. : *Agrobacterium rhizogenes*

ADN : acide désoxyribonucléique

ADN-T : Acide DéoxyriboNucléique de Transfert

AIA : acide indole acétique

ARN : acide ribonucléique

BET : bromure d'ethidium

BF : biomasse fraîche

BS : biomasse sèche

CLHP : chromatographie liquide haute performance (*cf.* HPLC)

CPG : chromatographie en phase gazeuse (*cf.* GC)

DMSO : Dimethyl Sulfoxide (C₂H₆OS)

DO : densité optique

DPI : Dots Per Inch (pixels par pouce). Nombre de pixels sur 2.54 cm² (pouce anglais), permettant d'exprimer la résolution d'une image. Une image affichée sur un écran est de 72dpi, une image destinée à l'impression est généralement de 300dpi.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

egfp : gène codant la protéine verte fluorescente modifiée

ENSAIA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

GFP : green fluorescent protein - protéine verte fluorescente d'*Aequorea victoria*

gus : gène codant pour l'enzyme de β-glucuronidase

H : hyoscyamine (289g/mol)

H&S: hyoscyamine + scopolamine

H6H : hyoscyamine-6β-hydroxylase

Homa : homatropine (275g/mol)

HPLC : chromatographie liquide haute performance (*cf.* CLHP)

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IUPAC: International Union for Pure and Applied Chemistry

Kb : kilo de base égale 1000 pb

m : mètre

M : molaire, mM : milimolaire

MeJa : Méthyle Jasmonate

MII : métabolites secondaires

MS : solution nutritive de Murashige et Skoog

mS/cm : milliSiemens/cm

NS : non significatif (utilisé pour les différences statistiques)

p/v : poids/volume

pb : paire de base

PCR : (*cf.* PCR), Polymerase Chain Reaction. Réaction en chaîne de la polymérase permettant d'amplifier un ADN dont la séquence des extrémités est connue.

rpm : rotation par minute

S : scopolamine (303g/mol)

SN : solution nutritive

T°C : température en degré centigrade

UFC : Unité Formant Colonie correspondant à la formation d'une colonie sur milieu gélosé.

UPJV : Université de Picardie Jules Verne

v/v : volume/volume

vir : gènes de virulence

vvm : volume d'air par volume de liquide et par minute

SOMMAIRE

Introduction générale et présentation des objectifs	1
---	---

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1. Les métabolites secondaires végétaux	7
I-1.1 Nature, distribution et rôle écologique des métabolites secondaires végétaux	7
I-1.2 Importance économique et pharmaceutique des métabolites secondaires végétaux.....	7
I-2. Procédés d'obtention de métabolites secondaire à partir de végétaux.....	9
I-2.1 Extraction de métabolites secondaires (MII) à partir de plantes entières.....	9
I-2.2 Biotechnologies végétales pour la production de MII végétaux	11
I-3. Les alcaloïdes tropaniques et leur occurrence chez <i>Datura innoxia</i> Mill.	20
I-3.1 Les alcaloïdes tropaniques, hyoscyamine et scopolamine	20
I-3.2 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques	22
I-3.3 <i>Datura innoxia</i> Mill., origine et description de la plante	25
I-3.4 Variation de la concentration et de la nature des alcaloïdes tropaniques au sein de la plante entière	26
I-3.5 Utilisations anciennes et modernes des daturas	29
I-4. Les cultures végétales hors sol	30
I-4.1 Cultures hydroponiques	31
I-4.2 Cultures aéroponique	32
I-4.3 Procédé « Plantes à Traire »	32
I-4.4 Intérêts et utilisations des cultures hors sol	33
I-5. Transformation génétique des végétaux par <i>Agrobacterium</i>	34
I-5.1 Organisation des plasmides pTi et pRi d' <i>Agrobacterium</i>	36
I-5.2 Les vecteurs dérivés du plasmide pTi et pRi d' <i>Agrobacterium</i>	38

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

II-1. Matériel	43
II-1.1 Matériel végétal	43
II-1.2 Matériel bactérien et vecteurs utilisés	43
II-1.3 Conditions de culture	45
II-2. Milieux de culture	46
II-2.1 Milieux de base pour bactéries	46
II-2.2 Milieux de culture basique pour les plantes de daturas	47
II-2.3 Milieu de régénération des racines de datura	47
II-2.4 Composés ajoutés en fonction des différentes expériences.....	47
II-3. Méthodes de culture	48
II-3.1 Culture de bactéries	48
II-3.2 Germination des graines de <i>Datura innoxia</i> en conditions stériles	49
II-3.3 Germination des graines de <i>Datura innoxia</i> en condition non stérile	50
II-3.4 Culture hydroponique en condition stérile	51
II-3.5 Culture hydroponique en condition non stérile	53
II-4. Méthodes analytiques	55
II-4.1 Morphologie racinaire et aérienne	55
II-4.2 Echantillonnages de biomasses	56
II-4.3 Dénombrement des microorganismes.....	56
II-4.4 Mesure de la dégradation de H&S dans les solutions nutritives	57
II-4.5 Méthode d'extraction	57
II-4.6 Méthode de dosage des alcaloïdes tropaniques	58
II-4.7 Méthode de dosage de l'azote total et du carbone total	61
II-4.8 Méthode de dosage des chlorophylles	61
II-5. Technique de transformation bactérienne par électroporation	62
II-5.1 Préparation des bactéries compétentes	62
II-5.2 Transformation bactérienne	62
II-5.3 Extraction et analyse d'ADN plasmidique	63
II-6. Evaluation de l'état transgénique du matériel végétal obtenu	64
II-6.1 Observation de la protéine EGFP	64
II-6.2 Test de détection de la β -glucuronidase (test histochimique X-gluc)	64
II-6.3 Confirmation moléculaire de la transformation	65
II-7. Traitement statistique des données	67

PARTIE III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Positionnement de la problématique scientifique69

CHAPITRE I : EFFET DE L'ENVIRONNEMENT ABIOTIQUE SUR LA CROISSANCE DES PLANTES ET LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES

**Effets de « l'environnement physique » sur la croissance et la production de
métabolites secondaires71**

**III-1. Mise en place d'un dispositif pilote de culture et essai d'amélioration de la
disponibilité en oxygène pour la respiration racinaire71**

III-1.1 Croissance végétative72

III-1.2 Production de biomasse74

III-1.3 Production de métabolites secondaires75

III-1.4 Discussion et conclusion partielle77

III-2. Effet de l'intensité de la lumière..... 78

III-2.1 Croissance des plantes cultivées sous quatre intensités d'éclairage..... 80

III-2.2 Production de biomasse sous quatre intensités d'éclairage..... 81

III-2.3 Production d'alcaloïdes tropaniques sous quatre intensités d'éclairage..... 82

III-2.4 Discussion et conclusion partielle84

III-3. Effet de la qualité de la lumière 85

III-3.1 Effet de la qualité de la lumière sur la croissance..... 85

III-3.2 Effet de la qualité de la lumière sur la (production de) biomasse.....87

III-3.3 Effet de la qualité de la lumière sur la production d'alcaloïdes tropaniques88

III-3.4 Discussion et conclusion partielle89

III-4. Effet combiné de la température et de la lumière90

III-4.1 Description du dispositif expérimental90

III-4.2 Contrôle du climat et variables climatiques de l'expérience92

III-4.3 Influence des paramètres environnementaux sur la croissance des plantes.....95

III-4.4 Influence des paramètres environnementaux sur la production de métabolites
secondaires100

III-4.5 Influence des paramètres environnementaux sur les microorganismes présents
dans la solution nutritive102

III-4.6 Effet de la microflore de la solution nutritive sur la dégradation des alcaloïdes tropaniques.....	104
III-4.7 Discussions et conclusion partielle	108
Effets de « l'environnement chimique » sur la croissance et la production de métabolites secondaires.....	110
III-5. Effet du pH des milieux de culture	110
III-5.1 Croissance végétative	111
III-5.2 Etude de la production de biomasse et des rendements	112
III-5.3 Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques	113
III-6. Effet de la disponibilité en azote du milieu sur la croissance, la biosynthèse et l'accumulation des alcaloïdes tropaniques	114
III-6.1 Description de l'expérience	115
III-6.2 Influence de l'apport azoté sur la croissance de la plante.....	116
III-6.3 Etude de la quantité d'alcaloïdes produites par plante	122
III-6.4 Discussion et conclusion partielle	124
III-7. Conclusion partielle du chapitre I	125

CHAPITRE II : EFFET DE L'ENVIRONNEMENT BIOTIQUE SUR LA CROISSANCE DES PLANTES ET LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES

Effets d'<i>Agrobacterium rhizogenes</i> sur les cultures hydroponiques	129
III-1. Effets comparés de différentes souches d'<i>A. rhizogenes</i>	129
III-1.1 Croissance végétative	129
III-1.2 Production de biomasse	131
III-1.3 Production de métabolites secondaires	132
III-2. Effets de la souche <i>A. rhizogenes</i> TR7	133
III-2.1 Croissance végétative	134
III-2.2 Production de biomasse	136
III-2.3 Production de métabolites secondaires	137
III-2.4 Evolution de la microflore dans la solution nutritive	139
III-2.5 Conclusion partielle	140

III-3. Utilisation de gènes rapporteurs <i>egfp</i> et <i>gus</i> en vue de comprendre l'effet d'<i>A. rhizogenes</i> TR7.....	141
III-3.1 Croissance végétative et production de biomasse	141
III-3.2 Production de métabolites secondaires	144
III-3.3 Evolution de la microflore dans la solution nutritive	146
III-3.4 Effet de la microflore de la solution nutritive sur la dégradation des alcaloïdes tropaniques	147
Développement de cultures hydroponiques stériles pour l'étude de l'interaction plante-microorganismes	149
III-4. Effets de la microflore dans la solution nutritive	149
III-4.1 Microflore et croissance des plantes	150
III-4.2 Microflore et accumulation d'alcaloïdes dans la plante	153
III-4.3 Discussion et conclusion partielle	154
III-5. Evaluation de la capacité d'absorption racinaire d'alcaloïdes présents dans la solution nutritive	155
III-5.1 Evolution de la concentration de H&S dans la solution nutritive	155
III-5.2 Accumulation de H&S dans la plante	156
III-5.3 Discussion et conclusion partielle	158
III-6. Effet de l'inoculation par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	159
III-6.1 Effet combiné d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> et d'une microflore diversifiée.....	159
III-6.2 Effet combiné d' <i>A. rhizogenes</i> TR7 et de l'acétosyringone utilisée comme activateur de virulence.....	165
III-7. Détermination des modalités d'action d'<i>Agrobacterium</i> par analyse des racines obtenues après co-culture plantes-bactéries en conditions axéniques.....	168
III-7.1 Co-cultures axéniques <i>Datura-Agrobacterium</i>	168
III-7.2 Etude de l'expression des gènes rapporteurs.....	170
III-7.3 Isolement de racines et réalisation de tests en culture in vitro.....	172
III-7.4 Confirmation moléculaire de l'état transgénique des racines.....	175
III-7.5 Caractérisation de la croissance et du métabolisme des racines transformées.....	181
III-7.6 Discussion et conclusion partielle.....	183
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	194
LISTE DE FIGURES – PLANCHES – TABLEAUX	211
ANNEXES	
CUMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE ET PRESENTATION DES OBJECTIFS

Les végétaux constituent depuis toujours une importante ressource naturelle pour les sociétés humaines. Ils servent à la fois pour l'alimentation et la confection d'autres biens de consommations nécessaires aux sociétés. Les plantes fournissent également de nombreux composés, tels que les arômes, les antioxydants, les huiles, les parfums, les cosmétiques et les molécules actives (médicaments). Ce sont des ressources renouvelables ; malheureusement certaines espèces sont en danger. Cela peut être dû à la destruction de leurs habitats naturels, mais aussi à une sur-exploitation des ressources en lien avec des difficultés techniques de cultures. L'ensemble de ces facteurs aggravants conduit à une réduction de la diversité végétale (Sato *et al.*, 2001) et pousse les professionnels à chercher des méthodes de culture alternatives (Roberts, 1998).

La domestication des plantes passant par la méthode traditionnelle de sélection du matériel végétal (croisements de lignées) est souvent longue. De plus, les plantes obtenues sont très sensibles aux stress (attaques de pathogènes, blessures). Par cette technique, on ne peut pas toujours être certain que les plantes sélectionnées, sur la base d'analyses faites à un moment donné, soient réellement celles qui présentent le meilleur potentiel de production.

La production de métabolites secondaires à partir de plantes issue de plein champ est dépendante de nombreux facteurs. Plusieurs solutions alternatives existent. La première est la synthèse chimique. Cependant, dans certains cas, le coût élevé, la complexité des molécules et l'aspect polluant de ce type de production rendent parfois cette synthèse chimique peu rentable. C'est pourquoi le développement de procédés biotechnologiques offre une alternative prometteuse pour améliorer la production de molécules à haute valeur ajoutée. Effectivement, les cultures de cellules et de tissus de plantes (cals, racines, tiges feuillées) offrent une alternative pour la production *in vitro* de métabolites secondaires utiles (Verpoorte *et al.*, 1991). Une telle culture permet de s'affranchir d'importantes variations climatiques, des risques induits par les agents pathogènes et est indépendante des conditions du sol.

Après de nombreuses études, et de nombreux essais réalisés, peu de résultats sont susceptibles de laisser envisager une exploitation industrielle. Quelques métabolites, comme la shikonine et la berbérine, peuvent être obtenue à partir de cultures cellulaires à grande échelle (Verpoorte *et al.*, 1991), mais la quantité de composés actuellement disponibles sur le marché issus de ces technologies est encore limité. Les principaux freins sont la faible productivité des cultures cellulaires et la nécessité d'adapter les technologies de production pour les composés

désirés. D'une manière générale, cette faible productivité est attribuée à différents facteurs tels que des taux élevés et/ou non équilibrés de phytohormones apportées en culture *in vitro*. Ces perturbations induisent une répression de la transcription de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse liées au métabolisme secondaire (Goddijn *et al.*, 1992). Ainsi, la synthèse de métabolites secondaires serait dépendante du degré de différenciation des cellules, d'un tissu, d'un organe (Su, 1995) et de l'état physiologique et génotypique de la plante mère (Yamada et Fujita, 1986).

Pour améliorer le rendement de ces procédés, de nombreuses stratégies ont été mises en œuvre : modifications de la composition des milieux de culture, en particulier au niveau de l'apport des régulateurs de croissance (auxines et cytokinines), l'élicitation, l'ajout de précurseurs, l'optimisation des facteurs environnementaux (oxygène soluble, éclairage, température ...) et l'immobilisation de cellules dans des matrices (alginate, agarose ou polyacrylamide) (Roberts, 1998). Mais la synthèse des métabolites secondaires en culture *in vitro* est très souvent influencée par la différenciation cellulaire, car dans la majeure partie des cas, elle est spécifique à certains tissus et même à certaines assises cellulaires au sein d'un même tissu. Cette culture ne permet pas une production compatible avec une exploitation industrielle ; d'autres stratégies de production ont donc été développées.

Une nouvelle approche s'est développée avec la découverte de la capacité que possède *Agrobacterium rhizogenes*, une bactérie tellurique, à transférer de l'information génétique dans des cellules végétales notamment racinaires afin de les pousser à se différencier en racines autonomes. Ces racines transgéniques, appelées « hairy root » (Hamill *et al.*, 1987 ; Verpoorte *et al.*, 1999), peuvent croître très rapidement et de façon stable sur un milieu dépourvu de phytorégulateurs. Du fait de leur structure organisée, les racines transformées produisent des quantités de molécules d'intérêt équivalentes, voire supérieures (Hamill *et al.*, 1990 ; Christen *et al.* 1990 ; Sauerwein *et Shimomura*, 1991 ; Palazon *et al.*, 1997, 1998), à celles de la plante mère. Ce nouveau matériel ouvre donc une opportunité pour étudier les voies de biosynthèse et de production des métabolites secondaires produits dans les racines de plantes entières. Cependant des modifications quantitatives et qualitatives peuvent exister chez ce type de matériel.

L'étape suivante consiste à transférer ce matériel végétal (racines transgéniques) en bioréacteurs (Boitel-Conti *et al.*, 1995a, 1995b, 1996 ; Sierra, 2007) à grande échelle, afin de produire une grande quantité de biomasse pour pouvoir par la suite déboucher sur une application industrielle. Le réacteur présente l'avantage de permettre un meilleur contrôle des paramètres du milieu de culture (pH, température, oxygène, sucre, azote ...). En général, la productivité de ce type de culture est meilleure que celle des suspensions cellulaires (Herman, 1993). L'exploitation des racines transgéniques pour la production de métabolites a nécessité le développement de

nouveaux bioréacteurs adaptés à ce matériel original (Giri *et* Narasu, 2000). Cependant, le passage du flacon simple (petit volume) au bioréacteur (grand volume) a permis d'évaluer les difficultés que l'on peut rencontrer en terme d'oxygénation, de maintien de la stérilité des cultures, et de contraintes physiques (cisaillement des racines dans le cas de bioréacteurs à agitation mécanique). La croissance des racines pourrait donc être relativement limitée. En effet, la montée en puissance en vue d'une production industrielle pose souvent des problèmes et de nouvelles difficultés. Pour adapter les conditions de culture ainsi que les procédés, beaucoup d'efforts et d'avancées ont été réalisés depuis une vingtaine d'années. Actuellement, certaines difficultés de ce type de production sont résolues et la culture de racines transgéniques permet d'obtenir une biomasse conséquente. Néanmoins, la limite réside dans la faible production de métabolites, ce qui nécessite le développement de nouvelles stratégies permettant d'améliorer leur productivité. La culture en condition hors-sol se présente alors comme une alternative possible pour palier à certaines de ces limites.

Depuis plusieurs dizaines d'années, dans le secteur maraîcher et horticole, on sait produire des plantes en culture hors-sol avec ou sans substrat (Morard, 1995). En l'absence de celui-ci, on utilise les systèmes de cultures hydroponiques ou aéroponiques. Ces systèmes permettent d'obtenir des plantes avec des racines ressemblant aux racines transformées cultivées *in vitro* (Gontier, 2001). Pour les plantes médicinales, ces racines cultivées en hydroponie contiennent des métabolites secondaires en plus grande quantité que celles de plantes cultivées en terre et leur vitesse de croissance est plus importante (Tran, 2005). Les stades phénologiques des plantes cultivés en hydroponie sont identiques de celles cultivées en terre. La production de métabolites secondaires avec ce type de culture semble donc possible et a permis d'obtenir certains résultats encourageants (Tran, 2005).

Mon travail de thèse s'inscrit dans la continuité de celui de Tran (2005), qui a été réalisé principalement au sein de l'équipe « Métabolites Secondaires » du laboratoire Agronomie et Environnement (UMR 1121), dirigé par le Professeur Sylvain Plantureux, à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de l'INPL-INRA. L'équipe de recherche dirigée par le Professeur Frédéric Bourgaud, qui travaille essentiellement sur deux plantes modèles : *Ruta graveolens* L., une plante méditerranéenne (amélioration de la production de métabolites secondaires par modulation des voies de biosynthèse) et *Datura innoxia* Mill., une plante tropicale (mise au point de procédé de production en culture hydroponique, « Plantes à Traire »). Lors de ma dernière année de thèse, j'ai intégré dans l'équipe « Datura » du Laboratoire « Androgénèse et Biotechnologie » dirigé par le Professeur Sangwan-Norreel, de l'UPRESEA 3900, appartenant à la Faculté des Sciences de l'Université de Picardie Jules Verne.

Datura innoxia Mill., plante modèle, utilisée tout au long de mes travaux, est une plante annuelle de la famille de Solanacées, produisant de nombreux métabolites secondaires dont les alcaloïdes tropaniques. Parmi ces composés, l'hyoscyamine et la scopolamine (H&S), représentants majeurs de cette famille, ont des propriétés pharmaceutiques remarquables. Ces molécules sont intéressantes d'un point de vue scientifique et industriel. Chez le datura, les teneurs en alcaloïdes tropaniques varient de 0,01 à 3% de matière sèche (MS), et peuvent atteindre 4% dans certains cas (Gontier, 2001). Les espèces de daturas se manipulent facilement en culture *in vitro*, ce qui en fait d'excellents modèles d'étude en laboratoire. Au niveau de la recherche agronomique sur les plantes médicinales, cette espèce peut également être une bonne plante modèle car des expériences de courte durée sont suffisantes pour décrire le comportement végétal à tous ses stades culturaux. En fait, *Datura innoxia* semblait parfaitement adaptée à la culture en hydroponie (Gontier *et al.*, 2002 ; Tran, 2005). Ces derniers avantages rendent cette plante intéressante dans un objectif de développement de nouveaux modes de production de métabolites secondaires. Cette plante, très vigoureuse, produit des alcaloïdes tropaniques (H&S), et sert de matériel d'étude pour le procédé « Plantes à Traire » (Gontier *et al.*, 2002 ; Tran, 2005). Ce procédé d'obtention de molécules végétales à haute valeur ajoutée est un intermédiaire entre la culture de plante entière au champ et la culture *in vitro* en bioréacteur (Brevet FR 99 14204, 1999 ; Gontier, 2001).

La technologie « Plantes à Traire » consiste à cultiver des plantes en condition hydroponique et à leur faire libérer, *via* les racines, des molécules d'intérêt à l'aide de traitements physiques (température, ultrasons) et/ou chimiques (tensioactifs) sans perte de viabilité pour les plantes. Les métabolites, excrétés par les racines, sont ensuite extraits du milieu nutritif. Le cycle de production peut être répété par des traitements successifs associés à un recyclage du milieu. La nécessité de développer le procédé pour optimiser la production à moindre coût et de façon simple et rapide devient donc incontournable.

Ce travail de thèse a été élaboré de façon transversale autour de l'étude de la physiologie végétale, de la biosynthèse, de l'accumulation de métabolites secondaires de la plante et de la littérature. J'ai ainsi axé mes recherches sur l'effet des environnements biotique et abiotique sur la croissance, le développement de la plante et l'accumulation des alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* cultivée en hydroponie.

Effectivement, dans le cadre d'une application industrielle, il est important d'appréhender l'ensemble des paramètres liés à l'obtention d'une biomasse de qualité (biophysiques, physiologiques et microbiologiques). Il s'agit de déterminer les meilleures conditions de culture pour un fort développement du système racinaire enrichi en molécules recherchées, afin de servir dans le procédé « Plantes à Traire » et contribuer à modéliser la production de métabolites en

culture hors-sol. Si les expériences effectuées avec *Datura innoxia* aboutissent, ces nouvelles méthodes pourront servir de base pour l'étude d'autres plantes. Ainsi, nos résultats permettront d'une part i) la compréhension scientifique des modèles développés, et d'autre part ii) d'ouvrir de nouvelles perspectives pour des applications industrielles.

La présente thèse s'articule autour de trois grandes parties. La première partie est une revue de la littérature qui rend compte des principaux travaux sur les métabolites secondaires, l'amélioration de leur production ainsi qu'une présentation générale de la plante modèle. La deuxième partie décrit les méthodes, les matériels et autres dispositifs utilisés lors des différentes expérimentations. La troisième partie expose les résultats obtenus et discute sur deux thèmes principaux dont le premier thème concerne les facteurs de l'environnement abiotique étudiés pour l'amélioration de la productivité des alcaloïdes. Tout d'abord, nous avons cherché à optimiser les conditions de culture par différents facteurs abiotiques indépendants et/ou combinés (température, lumière, pH, composition des minéraux du milieu ainsi que l'amélioration de la quantité d'oxygène soluble dans le milieu nutritif). Ces expériences nous ont permis de déterminer l'impact de certains facteurs sur l'évolution et l'accumulation de l'hyoscyamine et de la scopolamine dans la plante. Le deuxième thème est consacré à l'étude du rôle des microorganismes se développant naturellement dans la solution nutritive (facteurs biotiques). La présence de microflore dans le milieu de culture provoque une dégradation des molécules d'intérêt et altère leur accumulation dans la plante. Par contre, *A. rhizogenes* a un effet favorable sur la croissance et la biosynthèse de H&S. L'utilisation des agrobactéries peut donner lieu à des transferts naturels de gènes induisant ainsi l'obtention d'un pool racinaire chimérique regroupant des racines normales et des racines transformées. Nous avons pu mettre en évidence les modifications du phénotype racinaire après une co-culture avec des *A. rhizogenes*. Le mécanisme d'interaction plante-microorganisme ainsi que l'état transgénique de ces racines ont été vérifiés par des analyses moléculaires.

Nous avons enfin conclu ce travail et donnerons quelques perspectives de recherche pour la suite afin d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques de la plante ainsi que la production de métabolites secondaires en culture hors sol.

Partie I

Synthèse bibliographique

I-1. Les métabolites secondaires végétaux

I-1.1 Nature, distribution et rôle écologique des métabolites secondaires végétaux

Nous connaissons actuellement plus de 250000 espèces végétales. Celles-ci produisent un large éventail de substances chimiques de structures variées. Parmi elles, on distingue classiquement les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les métabolites primaires sont des produits issus directement des photoassimilats (sucres simples, acides aminés, protéines, acides nucléiques et organiques), qui participent à la structure de la cellule végétale ainsi qu'à son fonctionnement de base (Hopkins, 2003). Ils sont souvent produits en grande quantité mais présentent une valeur ajoutée relativement basse. Ces métabolites sont aussi définis comme des molécules qui se trouvent dans toutes les cellules végétales et, nécessaires à leur croissance et à leur développement (Raven *et al.*, 2000). Par opposition, les métabolites secondaires (MII) ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent de réactions chimiques ultérieures. Leurs rôles dans la physiologie de la plante ne sont pas encore tous élucidés. Ces composés sont limités à certaines espèces de végétaux et sont importants pour la survie et la valeur adaptative des espèces qui les synthétisent (Croteau *et al.*, 2000 ; Raven *et al.*, 2000).

Les métabolites secondaires sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans une autre (Raven *et al.*, 2000). Avec une structure chimique parfois complexe, ils sont très différents selon les espèces et s'accumulent le plus souvent en faible quantité. Ces molécules bioactives sont produites à différents endroits de la cellule dans des parties spécifiques de la plante en fonction du stade de développement (par exemple durant le développement de la plantule, de la fleur, du fruit, de la graine, ou de la racine). De façon générale, le rôle du métabolite secondaire est en lien avec sa localisation au sein de la plante (Pathak *et al.* 1962 ; Zobel et Brown, 1990). Par exemple, les furanocoumarines sont des substances antimicrobiennes (phytoalexines) jouant un rôle de défense contre les bactéries ou les champignons. Selon Zobel et Brown (1988a, 1988b), chez les plantes productrices, on les retrouve accumulées en grande quantité à la surface des feuilles où elles peuvent constituer une sorte de "première barrière chimique".

Les MII sont le reflet de la vie d'un écosystème; ils participent à la régulation de la démographie des plantes, ou des populations d'animaux qui établissent des relations avec les plantes. Ils ont donc un rôle écologique; par exemple, en attirant les insectes pollinisateurs, ou, au contraire, en repoussant les insectes ravageurs et les organismes pathogènes. Chaque espèce de plante possède un profil particulier de métabolites secondaires.

Beaucoup de métabolites se comportent comme des signaux chimiques que la plante utilise pour s'adapter aux changements défavorables de l'environnement (Chadhary *et al.*, 1985). D'autres ont pour rôle la défense de la plante contre les herbivores, les pathogènes, les parasites ou l'inhibition de la germination et la croissance des plantes concurrentes* (Baskin *et al.* 1967 ; Hale *et al.* 2004). Certains assurent une protection contre les radiations solaires, lorsque d'autres favorisent la dispersion du pollen et des graines grâce à la couleur ou au parfum des fleurs.

* *L'allélopathie est l'ensemble des interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre (micro-organismes inclus) au moyen de métabolites secondaires tels les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les alcaloïdes.*

I-1.2 Importance économique et pharmaceutique des métabolites secondaires végétaux

Les métabolites secondaires peuvent être classifiés de différentes façons selon leurs caractéristiques chimiques, l'origine de la plante ou l'origine biosynthétique du composé (tableau 1). Comparativement aux métabolites primaires, l'extraction de composés secondaires est souvent difficile à cause de leur faible niveau d'accumulation dans la plante (Kinghorn et Balandrin, 1993), ce qui induit un coût de production souvent assez élevé.

Tableau 1: Nombre de métabolites secondaires connus recensés dans « Dictionary of natural products » (d'après Verpoorte et Alfermann, 2000, repris de Chapman et Hall, 1998).

Nom des MII	Nombre des MII	Nom des MII	Nombre des MII
Aliphatics	5200	Lignans	1565
Alkaloids	15765	Oxygen heterocycles	1348
Amino acids, peptides	3921	Polycyclic aromatics	2448
Benzofuranoids	387	Polyketides	2442
Benzopyranoids	2694	Simple aromatics	4527
Carbohydrates	3210	Tanins	750
Flavonoids	8128	Terpenoids	27463

Actuellement, plus de 100000 molécules différentes sont connues et, 4000 nouveaux métabolites sont découverts chaque année (Verpoorte, 1999). Ainsi, on recensait plus de 85000 métabolites secondaires en 1988 (Verpoorte, 2000) dont 16000 alcaloïdes et plus de

33000 terpénoïdes. Ces composés présentent un intérêt économique notable. On estime en effet qu'au moins 25% des spécialités pharmaceutiques mises sur le marché proviennent de plantes médicinales ou de produits dérivés de celles-ci (Verpoorte, 2000). Environ 75% des médicaments prescrits actuellement dérivent des produits naturels (Farnsworth et Soejarto, 1991 ; Kinghorn et Balandrin, 1993). Cragg *et al.* (1997) confirment que la plupart des antibiotiques et des antitumoraux sont des produits naturels dont une grande part provient des plantes. De même, Verpoorte (2000) rapporte qu'entre 1983 et 1994, 78% des nouveaux antibiotiques et 61% des nouveaux antitumoraux autorisés sur le marché sont des produits d'origine naturelle issus des plantes, ou dérivés de ces produits. Beaucoup d'extraits végétaux (*i.e.* contenant des MII) sont utilisés dans l'industrie non alimentaire (gommes, édulcorants, colorants, pesticides, ...), pour l'élaboration de cosmétiques et de parfums (tanins, huiles essentielles), ou encore comme principes actifs médicamenteux (hétérosides cardiotoniques, alcaloïdes tropaniques et morphiniques, ...).

Cependant, comme il a déjà été rapporté dans l'introduction générale, l'obtention de ces métabolites secondaires d'intérêt thérapeutique à partir de plante pose différents problèmes d'approvisionnement. La complexité structurale de ces substances rend souvent leur synthèse difficile et/ou trop onéreuse. Ces divers problèmes ont rendu nécessaire la recherche d'alternatives de production. Les biotechnologies végétales se sont développées et offrent de nouvelles opportunités pour produire ces molécules à haute valeur ajoutée.

I-2. Procédés d'obtention de métabolites secondaires à partir de végétaux

I-2.1 Extraction de métabolites secondaires à partir de plantes entières

Les végétaux sont utilisés par l'homme pour des applications très diverses et en particulier à des fins thérapeutiques. Dans le cas des plantes médicinales, leur utilisation par la médecine traditionnelle remonte à plusieurs milliers d'années. Ainsi, on utilise soit des tissus végétaux frais (par exemple pour soigner des blessures), soit des plantes séchées à partir desquelles on prépare des décoctions ou macérations pour le traitement de diverses maladies.

Tableau 2: Liste non exhaustive d'agents phytochimiques importants et de plantes médicinales utilisés en médecine moderne (Wijrsekera, 1991 repris de Tran, 2005).

Composés	Plantes	Composés	Plantes
Acetyldigoxin	<i>Digitalis lanata</i>	Hydrastine	<i>Hydrastis canadensis</i>
Adoniside	<i>Adonis vernalis</i>	Kawain, dihydrokawain	<i>Piper methysticum</i>
Aescin	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Khellin	<i>Ammi visnaga</i>
Ajmaline	<i>Rauwolfia vomitoria</i> , <i>R. serpentina</i>	Lanatosides	<i>Digitalis lanata</i>
Ajmalicine	<i>Catharanthus roseus</i> , <i>Rauwolfia</i> spp.	Leurocristine (Vincristine)	<i>Catharanthus roseus</i>
Alloin (Barbaloin)	<i>Aloe barbadensis</i>	Linoleic acid (GLA)	<i>Nonnea macrosperma</i> , <i>Scrophularia marilandica</i>
Anisodamine	<i>Anisodus tanguticus</i>	Alpha lobeline	<i>Lobelia</i> spp.
Anisodine	<i>Scopolia tanguticus</i>	Menthol	<i>Mentha</i> spp.
Arecoline	<i>Areca catechu</i>	Morphine	<i>Papaver</i> spp.
Belladonna	<i>Atropa belladonna</i>	Papain	<i>Carica papaya</i>
Berberine	<i>Berberis</i> spp., <i>Coscinium fenestratum</i>	Palmatine	<i>Berberis</i> spp.
Boldine	<i>Peumus boldus</i>	Physostigmine	<i>Physostigma venenosum</i>
Bromelain	<i>Annanas comosus</i>	Pilocarpine	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Brucine	<i>Brucea</i> spp.	Procillaridin A	<i>Urginea</i> spp., <i>U. maritima</i> , <i>U. indica</i>
Caffeine	<i>Camelia sinensis</i> , <i>Theobroma cacao</i>	Protoveratrines A & B	<i>Veratrum album</i>
Camphor	<i>Cinnamomum camphora</i>	Quinghausa = Artemisinin	<i>Artemisia annua</i>
Capsaicine ; oleoresin	Capsicum <i>Capsicum</i> spp.	Quinine	<i>Cinchona</i> spp.
Cephaeline	<i>Cephaelus</i> spp.	Quinidine	<i>Rauwolfia serpentina</i>
Cocaine	<i>Erythroxylon coca</i>	Rescinnamine	<i>R. canescens</i> , <i>R. vomitoria</i> , <i>etc.</i>
Codein	<i>Papaver</i> spp.	Reserpine & deserpine	<i>Ruscus aculeatus</i>
Colchicine	<i>Colchicum autumnale/Gloriosa superba</i>	Ruscogenins	<i>Cassia</i> spp., <i>Fagopyrum</i> spp.
Convallatoxin	<i>Convallaria majalis</i>	Rutin	<i>Artimisia cina</i> , <i>A. maritima</i>
Curcumin	<i>Curcuma longa</i>	Santonin	<i>Urginea</i> spp.
Deserpidine	<i>Rauwolfia</i> spp.	Scillarins A & B	<i>Scopolia tangutica</i> , <i>Datura metel</i>
Digitoxin	<i>Digitalis lanata</i>	Scopolamine	<i>Cassia augustifolia</i> , <i>C. acutifolia</i>
Digoxin, Digitoxigenin	<i>Digitalis lanata</i>	Sennosides A & B	<i>Silybium marianum</i>
L-Dopa	<i>Mucuna pruriens</i>	Silybin, silydianin, silychristin	<i>Spartium scoparium</i> , <i>Cytisus scoparius</i>
Emetine	<i>Cephaelis ipecacuanha</i> , <i>C. acuminata</i>	Sparteine	<i>Strychnos nux-vomica</i>
Ephedrine, Pseudoephedrine	<i>Ephdra</i> spp.	Strychnine	<i>Cannabis</i> spp.
Erysimine (=Helveticoside), Erysimoside	<i>Erysimum canescens</i>	Tetrahydrocannabinol (THC)	<i>Theobroma cacao</i>
Eugenol	<i>Eugenia caryphyllata</i> <i>Cinnamomum</i> spp.	Theobromine	<i>Theobroma cacao</i>
Forskolin	<i>Coleus forskohlii</i>	Theophylline	<i>Strychnos toxifera</i>
Glycyrrhizin, glycyrrhizinic acid & glycyrrhetic acid	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Tubocurarine	<i>Vinca minor</i>
Guggul steroids	<i>Commiphora</i>	Vincamine	<i>Catharanthus roseus</i>
Hyoscyamine	<i>Datura</i> spp. ; <i>Hyoscyamus muticus</i>	Vincalécoblastine (vinblastine)	<i>Valeriana officinalis</i> , <i>V. wallichii</i>
Hyoscine	<i>Duboisia</i> spp.	Vincristine (leurocristine)	<i>Ammi majus</i>
Hesperidine	<i>Citrus</i> spp.	Valepotriates	<i>Pausinystalia yohimbe</i>
		Xanthotoxin	
		Yohimbine	

Depuis un peu plus d'un siècle (développement de l'allopathie), sur la base de ces médecines traditionnelles, l'homme a développé des procédés d'extraction qui ont permis la fabrication de médicaments à partir d'agents phytochimiques extraits des plantes (tableau 2).

Parallèlement les progrès de la chimie ont permis la synthèse de la plupart des matières actives intervenant dans la composition des médicaments. Néanmoins, les plantes médicinales sont encore cultivées au champs ou récoltées dans les espaces naturels afin d'en extraire des principes actifs que l'on ne sait pas synthétiser à faible coût et/ou avec un rendement suffisant. C'est tout particulièrement le cas dans les pays en développement, où l'extraction de métabolites secondaires à partir de plantes entières est souvent faite pour des raisons d'abord économiques (coût des médicaments). Ceci explique pourquoi on trouve encore la co-existence de deux systèmes de médecine (traditionnelle et moderne) dans divers pays tels que la Chine, l'Inde (Liu *et al.*, 2001 ; Nadeem *et al.*, 2002 ; Sreevalli *et al.*, 2004 ; Kumar *et al.*, 2003) et le Viet Nam (Lê, 1997).

I-2.2 Biotechnologies végétales pour la production de MII végétaux

Aujourd'hui, la demande en produits d'origine végétale est en forte croissance et la production de métabolites secondaires par l'intermédiaire de cultures aux champs est parfois insuffisante à cause de rendements limités (maladies, ravageurs, problèmes climatiques, voire difficultés géopolitiques). Par ailleurs, beaucoup de plantes intéressantes ne peuvent être cultivées que dans des conditions pédo-climatiques particulières, d'où la nécessité d'importer ces produits, à un coût parfois élevé. Ces diverses considérations ont conduit les chercheurs à se tourner vers de nouvelles voies de production en faisant appel aux techniques de cultures *in vitro* et à la production en bioréacteur (Boitel-Conti *et al.*, 1995b ; Bourgaud *et al.*, 2001 ; Gontier, 2001). Les organes, cellules ou tissus végétaux ainsi produits sont ensuite soumis à diverses méthodologies d'extraction en vue d'obtenir les métabolites secondaires recherchés. Ces techniques sont destructives et nécessitent de régénérer la biomasse pour assurer de nouvelles productions. Afin de diminuer le surcoût engendré par la destruction de la biomasse, des scientifiques ont développé des techniques permettant de faire libérer les métabolites secondaires dans le milieu de culture sans perte de viabilité du matériel végétal. Ces techniques visant à stimuler la synthèse puis la libération de métabolites secondaires dans le milieu de culture seront présentées par la suite.

Volontairement, nous focaliserons le plus souvent nos exemples sur la production d'alcaloïdes tropaniques à partir de plantes de la famille des Solanacées.

I-2.2.1 Stimulation de la synthèse des métabolites secondaires

En culture *in vitro* (*i.e.* en bioréacteur), la synthèse des métabolites secondaires peut être stimulée en jouant sur différents paramètres (tableau 3): facteurs environnementaux, utilisation de précurseurs des molécules ciblées, mise en oeuvre d'éliciteurs et transformation génétique du végétal pour augmenter les flux au sein des voies de biosynthèse des composés recherchés.

Tableau 3: Exemples de traitements ayant permis de stimuler la production de MII dans la biomasse végétale de cellules ou organes cultivés *in vitro*.

Variété	Traitement	Effet sur la quantité de M II	Référence
<i>Brugmansia candida</i>	Chitosan 10-100mg/L	x1,3 Hyoscyamine, Scopolamine	Pitta-Alvarez et Giulietti, 1999
	AlCl ₃ 25 – 250µM Acide jasmonique 2,5-25µg/mL	x1,4-1,8 Hyoscyamine et Scopolamine	Spollansky <i>et al.</i> , 2001
<i>Datura innoxia</i>	Précurseurs + Tween20	x1,4 Hyoscyamine	Boitel-Conti <i>et al.</i> , 2000
	Transformation par <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (LBA 9402 - <i>h6h</i>)	x3 Scopolamine	Dechaux-Duval, 2005
<i>Datura stramonium</i>	Meja, parois cellulaires fongiques, oligogalacturonide	x1,4-2,3 Littorine, Hyoscyamine, Scopolamine	Zabetakis <i>et al.</i> , 1999 Cusido <i>et al.</i> , 1998
<i>Datura metel</i>	Transformation par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	x1,3 Scopolamine	Moyano <i>et al.</i> , 2003
	Transformation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58C1 - pRiA4 - <i>pmt</i>)	x0,5-3 Hyoscyamine et Scopolamine	
<i>Hyoscyamus muticus</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (C58C1 - pRiA4 - <i>pmt</i>)	x3 Hyoscyamine	Moyano <i>et al.</i> , 2003
<i>Pinus sylvestris</i>	CO ₂ 600-700ppm	x1,2 Composés phénoliques	Sallas <i>et al.</i> , 2001 ; Palomäki <i>et al.</i> , 1998
<i>Rubia tinctorum</i>	Chitosan 200mg/L	x1,6 Anthraquinone	Vasconsuelo <i>et al.</i> , 2004
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	x5-6 Composés phénoliques	Keller <i>et al.</i> , 1996
<i>Taxus chinensis</i>	Chitosan, ABA, MeJa, Nitrate d'argent, phénylalanine, benzoate de sodium, glycine 10-30mg/L	x2 Taxol	Luo et He, 2004

Effets de l'environnement abiotique

Les facteurs environnementaux comme la lumière, la température, le rayonnement UV-B, l'ozone et le CO₂ ont une influence directe ou indirecte sur l'élaboration des métabolites secondaires. Ces aspects ont été illustrés par Demeyer et Dejaegere (1997) ; Sallas *et al.* (2001) ; Teglberg et Julkumen-Tiitto (2001) qui ont travaillé sur *Salix myrsinifolia*, *Pinus sylvestris* ou encore *Datura stramonium*. A titre d'exemple, la teneur en composés phénoliques dans les aiguilles de *Pinus sylvestris* L. est ainsi augmentée de 25% sous l'effet d'une concentration élevée de CO₂ (Sallas *et al.*, 2001).

Effet de l'ajout de précurseurs dans le milieu de culture des cellules et organes végétaux

Dans certaines situations, dans le but de raccourcir les processus métaboliques et d'augmenter la biosynthèse de composés spécifiques, il est possible de fournir au matériel végétal des précurseurs des composés d'intérêt. Ainsi, Boitel-Conti *et al.* (2000) ont mis au point un protocole utilisant des précurseurs en vue de stimuler la synthèse d'alcaloïdes chez *Datura innoxia*. L'addition de précurseurs (ornithine, arginine, phénylalanine, DL-β-acide phényllactique, tropanone), combinée à un traitement à l'aide de tensioactif (Tween20) provoque une augmentation (+40%) de la teneur en hyoscyamine dans des cultures de racines transformées (hairy roots). Par contre, l'ajout de précurseurs sans traitement au Tween20 (*i.e.* stress), ne stimule pas la production des métabolites secondaires dans les racines de *Datura innoxia* (Boitel-Conti *et al.*, 2000).

Par ailleurs, nombreux sont les exemples où l'ajout de précurseurs, sur des cultures *in vitro* de plantes médicinales a pu donner des résultats positifs en terme d'augmentation de la production de métabolites secondaires. Dans la plupart des cas de figures, au moins une partie des molécules ajoutées est biotransformée en composés plus complexes et à plus haute valeur ajoutée par les cellules végétales (Kitamura *et al.*, 1993 ; Déchaux-Duval, 2005 ; Tran, 2005).

Eliciteurs et effets éliciteurs

La majorité des végétaux, lorsqu'ils subissent une attaque par des agents pathogènes (insectes, champignons) produisent des métabolites secondaires toxiques pour assurer leur défense. Cette réaction de défense des plantes fait intervenir des molécules, appelées éliciteurs, qui jouent un rôle d'activateur de gènes de défenses (Somssich et Hahlbrock, 1998). Ces éliciteurs peuvent être de différentes natures et proviennent le plus souvent de

l'agent pathogène. Souvent, les premières étapes des réactions de défense des plantes font intervenir des messagers tels que l'acide jasmonique qui se retrouve de ce fait lui aussi classé dans la catégorie des éliciteurs. Différentes équipes ont appliqué ce mécanisme afin de stimuler la production des métabolites secondaires (Herman, 1993 ; Poulev *et al.*, 2003 ; Bais *et al.*, 2001 ; Bais *et al.*, 2004).

Certains auteurs ont utilisé des extraits de champignons pour activer les gènes de défense des cellules végétales. Keller *et al.* (1996) ont ainsi libéré un éliciteur préparé à partir de *Phytophthora infestans* pour augmenter la production de composés phénoliques chez *Solanum tuberosum*. D'autres chercheurs ont utilisé le méthyle jasmonate (MeJa) connu pour sa capacité à agir sur le système de défense des plantes (Somssich et Hahlbrock, 1998). En vue de produire des métabolites secondaires, Zabetakis *et al.*, (1999) ont aussi réalisé des expériences faisant intervenir 3 types d'éliciteurs: du MeJa, des parois cellulaires fongiques (préparation à partir d'extraits de levure), et un oligogalacturonide. Chaque éliciteur est ajouté séparément dans le milieu de culture de cellules de *Datura stramonium*. Parmi ces trois facteurs, Le MeJa s'est avéré être le plus efficace pour éliciter la production de littorine, d'hyoscyamine et de scopolamine.

De même, le chitosane est lui aussi bien connu comme agent éliciteur en relation avec les mécanismes de défense des végétaux. Doares *et al.* (1995) ont prouvé qu'il peut stimuler l'accumulation d'acide jasmonique. Cette molécule est aussi utilisée afin d'augmenter la teneur en métabolites secondaires (hyoscyamine, scopolamine, anthraquinone, taxol) chez les cultures de cellules végétales *in vitro* (Pitta-Alvarez et Giulietti, 1999 ; Vasconsuelo *et al.*, 2004 ; Luo et He, 2004).

Les métaux comme le cuivre et l'aluminium, phytotoxiques à haute concentration, sont souvent décrits comme éliciteurs des mécanismes de défense des végétaux, en particulier chez les plantes tolérantes aux métaux lourds (Hamel *et al.*, 1998 ; Agrawal *et al.*, 2003). Cette propriété a été utilisée pour stimuler des productions de métabolites secondaires. Ainsi Spollansky *et al.* (2000) ont réussi à augmenter la production d'hyoscyamine et de scopolamine dans des racines transformées de *Brugmansia candida* en utilisant $AlCl_3$. Après 48h de mise en contact avec la solution d' $AlCl_3$, les alcaloïdes augmentent de 43 à 83%.

Effets possibles de la transformation génétique

La transformation génétique des plantes, bien que très controversée en France aujourd'hui, peut permettre d'une part, de mieux connaître le métabolisme des végétaux et,

d'autre part, de générer de la biomasse hyper-productrice de métabolites secondaires à usage pharmaceutique (Lièvre, 2004).

Ainsi, la culture de racines transformées par *A. rhizogenes* permet, dans certains cas, d'améliorer la production de métabolites (Bajaj, 1999). Dans ce but, la souche A4 d'*A. rhizogenes* a souvent été utilisée pour la transformation de daturas (Boitel-Conti *et al.*, 1995b; Cusido *et al.*, 1998). Dans le cas des racines transformées, la surproduction de métabolites secondaires semble essentiellement due à une modification du métabolisme de base des cellules végétales (Filippini *et al.*, 1994 ; Maurel *et al.*, 1994), suite à l'intégration et à l'expression d'oncogènes venant de la bactérie (modification de la balance hormonale) (Veluthambi *et al.* 1989)

Par opposition, la transformation génétique peut être mise en place en utilisant des souches d'agrobactéries possédant sur leur(s) plasmide(s) un (ou plusieurs) gène(s) d'intérêt(s) permettant l'augmentation des flux métaboliques. Ainsi, chez des Solanacées, la teneur en alcaloïdes a pu être augmentée par transformation génétique suite à l'introduction du gène *pmt* codant l'enzyme Putrescine N-Methyltransferase (PMT- EC 2.1.1.53) pour une des premières enzymes de la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques (Moyano *et al.*, 2003). Ce gène a été introduit dans des racines de *Datura metel* et *Hyoscyamus muticus* à l'aide d'*A. tumefaciens*. La production d'hyoscyamine et de scopolamine a été accrue dans les racines transformées de *Datura metel*, alors que chez *Hyoscyamus muticus*, une augmentation de la production d'hyoscyamine a été obtenue. Afin d'augmenter la teneur de scopolamine, le gène d'*Hyoscyamus niger* codant l'enzyme hyoscyamine-6 β -hydroxylase (H6H EC 1.14.11.11), responsable de la formation de la scopolamine à partir de l'hyoscyamine, a été introduit dans ce matériel végétal via *A. rhizogenes* (Déchaux-Duval, 2005).

I-2.2.2 Procédés permettant l'obtention de MII à partir de biomasse végétale *in vitro* sans perte de viabilité des cellules ou tissus

De manière générale, l'obtention de métabolites secondaires à partir de biomasse végétale *in vitro* est obtenue par extraction. Les procédés mis en oeuvre sont souvent délicats et complexes et présentent des rendements variables. De plus, ils sont destructifs et impliquent le sacrifice de la biomasse ce qui peut être un facteur limitant d'un point de vue économique. Ce constat a conduit divers auteurs à développer des traitements permettant la libération des métabolites secondaires dans le milieu de culture sans perte de viabilité du matériel végétal.

Dans le cas des cultures d'organes (racines transformées), cet objectif a pu être atteint *via* la mise en oeuvre de techniques de perméabilisation des cellules (tableau 4). Ces dernières font le plus souvent appel à des composés chimiques, des traitements physiques ou encore l'utilisation d'adsorbants ou de résines échangeuses d'ions (Amberlites). C'est ce que nous allons présenter succinctement.

Tableau 4: Exemples de traitements de cellules ou d'organes végétaux *in vitro* ayant permis la libération de métabolites secondaires dans le milieu de culture.

Variété	Traitement	Effet sur la quantité de Met II	Référence
<i>Beta vulgaris</i>	pH 4	x1,1 Bétalaine	Thimmaraju <i>et al.</i> , 2003
	Sonication 0,02MHz	x1,1 Bétalaine	
	Température 40°C	x1,1 Bétalaine	
	Electroporation	x1,9 Bétalaine	Fincan <i>et al.</i> , 2004
<i>Brugmansia candida</i>	AlCl ₃ 25 – 250µM	x2,5 – 9,5 Hyoscyamine et Scopolamine	Spollansky <i>et al.</i> , 2001
	Acide jasmonique 2,5-25µg/mL		
	Acide acétique 0,16mM, acide citrique 16mM	x1,5 Hyoscyamine et Scopolamine	Pitta-Alvarez <i>et al.</i> , 1999
<i>Catharanthus roseus</i>	Adsorbant XAD7	x1,2 Catharanthine et x1,7 Ajmalicine	Sim <i>et al.</i> , 1994
	KCl 6g/L	x2 - 2,5 Catharanthine, Ajmalicine	Zhao <i>et al.</i> , 2000
	NaCl 6g/L	x1,5 - 2 Catharanthine, Ajmalicine	
	Alginate 1,5%	x4 - 6 Catharanthine, Ajmalicine	
	Polyvinyl pyrrolidone 0,2%	x3 - 4 Catharanthine, Ajmalicine	
<i>Datura innoxia</i>	Tensioactif (Tween20) 1-5%	x100 Hyoscyamine et Scopolamine	Boitel-Conti <i>et al.</i> , 1995-2000
<i>Fragaria ananassa</i>	Température 45°C	x1,8 Anthocyanes	Takeda <i>et al.</i> , 2003
<i>Glycine max</i>	Méthanol 20%	x1,1-1,2 daizeine	Komolpis <i>et al.</i> , 1998
	Adsorbant XAD4	x1,2-1,3 Daidzeine	
<i>Taxus chinensis</i>	Dibutylphthalate 10%	x1,4 Taxol	Wang <i>et al.</i> , 2001

Perméabilisation cellulaire par traitements chimiques

➤ Perméabilisation cellulaire à l'aide de tensioactifs

Les tensioactifs sont les molécules amphiphiles, c'est-à-dire présentant une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ces molécules organiques tels que le Tween20,

Tween80, DMSO, Triton100X ou encore le SDS sont couramment utilisées afin de stimuler le relargage des composés chimiques à partir de cellules vivantes, en particulier de tissus végétaux.

Boitel-Conti *et al.* (1995, 1997) ont utilisé avec succès le Tween20 pour perméabiliser les racines transformées de *Datura innoxia*. Après 30 heures de perméabilisation, la libération dans le milieu de culture de l'hyoscyamine et de la scopolamine est augmentée de plus de 100 fois par rapport au témoin. L'excrétion des alcaloïdes est maximisée entre 18 et 24 heures. En dehors de l'effet de perméabilisation, le Tween20 présente aussi la capacité de stimuler la synthèse d'hyoscyamine et de scopolamine (Boitel-Conti *et al.*, 1996), soit par effet éliciteur, soit en provoquant de manière indirecte une levée de rétro-inhibition d'enzymes de la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques.

➤ **Perméabilisation cellulaire à l'aide de solvants organiques**

La perméabilisation de matériel végétal à l'aide de solvants organiques a aussi été étudiée *in vitro* sur cellules ou à partir d'organes ou de tissus issus de plantes entières. Par exemple, Komolpis *et al.* (1998) ont réussi la perméabilisation de graines de soja grâce à du méthanol (20% v/v). Environ 15 à 20% de daidzeine se trouve relarguée dans le solvant et 70% des graines sont encore aptes à germer après le traitement.

Divers types de traitement ont aussi été appliqués sur des cellules de *Taxus chinensis* afin de favoriser la libération de taxol. De l'hexadecane, du decanol, et/ou du dibutylphthalate ont été ajoutés dans le milieu de culture *in vitro*. Tous ces solvants sont capables de stimuler la libération du taxol. Cependant, le meilleur solvant est le dibutylphthalate. Il permet d'extraire le taxol tout en ayant une action réduite sur le développement ultérieur des cellules (Wang *et al.*, 2001).

Spollansky *et al.* (2000) ont stimulé la libération d'hyoscyamine et de scopolamine dans le milieu de culture de racines transformées de *Brugmansia candida* par l'addition d'AlCl₃, et d'acide jasmonique. La libération des alcaloïdes dans le milieu de culture est augmentée d'un facteur 10 environ pour le traitement à l'aide d'acide jasmonique, et d'un facteur 2,5 environ pour le traitement avec l'AlCl₃. Force est donc de constater qu'il peut parfois exister un lien étroit entre élicitation et perméabilisation. En effet, Boitel-Conti *et al.* (1996) ont observé une élicitation en perméabilisant des tissus de daturas par Tween20. Spollansky *et al.* (2000) ont eux observé une libération de métabolites secondaires dans le milieu de culture consécutivement à l'application de traitements éliciteurs.

➤ **Ajout d'acides organiques et effet du pH**

L'acide acétique et l'acide citrique exercent une influence sur la production et la libération d'hyoscyamine et de scopolamine chez les racines transformées de *Brugmansia candida* (Pitta-Alvarez et Giulietti, 1999). Quarante huit heures après l'addition d'acide acétique ou d'acide citrique, la teneur des deux composés (H&S) est augmentée dans la solution nutritive. En plus, l'acide acétique associée à un pH bas est très favorable à la libération des alcaloïdes tropaniques.

Les conditions de pH acide facilitent la perméabilisation des végétaux (Thimmaraju *et al.*, 2003). Les racines de *Beta vulgaris* peuvent ainsi libérer jusqu'à 70% de bétalaine dans un milieu à pH 2, mais la viabilité des cellules chute à de 90%. Avec un milieu à pH 4, il n'y a que 10% de bétalaine relargués dans la solution nutritive, mais les racines gardent leur viabilité (Thimmaraju *et al.*, 2003).

Perméabilisation cellulaire par traitements physiques

De même que des traitements chimiques ont pu être utilisés pour obtenir une libération de métabolites secondaires à partir de biomasse végétale, certains traitements physiques réalisés dans des conditions parfaitement contrôlées ont pu aboutir à des résultats très probants.

➤ **Effets de la sonication**

La sonication est souvent utilisée pour extraire les composés chimiques à partir des végétaux (Wu *et al.*, 2001 ; Hromádková et Ebringerová, 2003). Certains auteurs ont cherché à perméabiliser les cellules par cette technique afin de libérer les métabolites secondaires sans pour autant compromettre la viabilité cellulaire. Thimmaraju *et al.* (2003) ont ainsi perméabilisé des racines transformées de *Beta vulgaris*, sans perte de viabilité, à l'aide d'ultrasons à 0,02 MHz. Ils obtiennent un maximum de 12% de bétalaine libérée dans le milieu de culture.

➤ **Effets de la température**

Les pigments végétaux sont souvent obtenus par perméabilisation des tissus en jouant sur la température. Dans le cas de la production d'anthocyanes, pigments synthétisés chez le fraisier, Takeda *et al.* (2003) ont incubé des cellules de fraise entre 26 et 60°C. Ils ont pu montrer que la viabilité des cellules et la libération de l'anthocyane était optimale à 45°C.

D'autres pigments tels que la bétalaine des racines de *Beta vulgaris* ont aussi été obtenus grâce à une perméabilisation par la température. La solution nutritive dans laquelle sont cultivées ces racines est chauffée à 40, 45, 50°C. Après 30 minutes, le plus grand taux d'excrétion de bétalaine dans la solution nutritive est de 47% à 50°C et 31% à 45°C, respectivement. Par contre les racines ne peuvent pas survivre. A 40°C, la libération de bétalaine n'est que de 5,4% mais les racines sont encore vivantes après le traitement. La meilleure libération a atteint 13,4% avec un traitement à 40°C pendant 60 minutes (Thimmaraju *et al.*, 2003).

➤ Effets de l'électroporation

Les cellules végétales peuvent être perméabilisées à l'aide d'un champ électrique (Knorr et Angersbach, 1998 ; Lebovka *et al.*, 2001 ; Angersbach *et al.*, 2000). Avec un potentiel transmembranaire de 1 volt, des pores commencent à se former sur la membrane cellulaire et vont favoriser la libération des constituants cellulaires (Fincan *et al.*, 2004). Selon ce principe, des racines de betterave (*Beta vulgaris*) ont ainsi été "électroperméabilisées" afin de libérer les bétalaines (Fincan *et al.*, 2004). Après une heure de traitement, 90% des pigments sont relargués dans le milieu de culture. Ce type de perméabilisation électrique (électroporation) est communément utilisé en génie génétique pour permettre l'intégration de plasmides dans des bactéries préalablement rendues électro-compétentes.

Utilisation d'adsorbants ou de résines échangeuse d'ions

Les amberlites XAD sont souvent utilisées lors de traitements de perméabilisation pour absorber les métabolites secondaires. Dans ce cas, il y a un effet synergique entre la perméabilisation des cellules et l'adsorption des métabolites sur les XAD. Par exemple, Sim *et al.* (1994) ont montré que la production d'alcaloïdes à partir de cellules de *Catharanthus roseus* augmente en ajoutant de la résine XAD 7 au cours de la perméabilisation par le diméthyle sulfoxyde. Komolpis *et al.* (1998) ont utilisé une résine XAD 4 lors de la perméabilisation de graines de soja. En vingt quatre heures, le XAD 4 accroît de 20 à 33% le relargage de daidzeine pendant la perméabilisation de graines de soja avec du méthanol à 20%.

I-3. Les alcaloïdes tropaniques et leur occurrence chez *Datura innoxia* Mill.

I-3.1 Les alcaloïdes tropaniques, hyoscyamine et scopolamine

« Les métabolites secondaires sont des composés dont la présence est restreinte à certains groupes taxonomiques; ils ne sont pas essentiels à la vie de la cellule - de l'organisme - mais jouent un rôle au niveau de l'interaction avec l'environnement favorisant ainsi la survie de l'organisme dans son écosystème » (Verpoorte, 2000).

Au cours de l'évolution, le règne végétal a développé une large variété de métabolites secondaires pour se défendre des herbivores, des microorganismes, des virus et des champignons. Parmi plus de ces 100 000 produits naturels connus aujourd'hui, environ 12000 sont des alcaloïdes. Une définition simple et générale des alcaloïdes a été proposée par Pelletier (1983) : « un alcaloïde est un composé cyclique contenant un azote réduit et de distribution restreinte parmi les organismes vivants ».

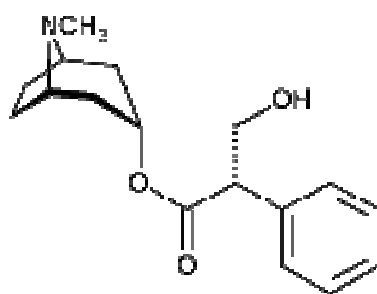
Les alcaloïdes sont essentiellement présents chez les Angiospermes, environ 10 à 15% d'entre elles synthétisent ce type de molécules, et plus particulièrement les Dicotylédones. Certains alcaloïdes sont présents dans plusieurs genres appartenant à des familles très différentes (caféine). D'autres sont limités à quelques genres à l'intérieur d'une même famille (hyoscyamine) ou sont limités à un groupe d'espèces à l'intérieur d'un même genre (thébaïne), ou bien sont restreints à une seule espèce (morphine). Le contenu en alcaloïdes varie de quelques ppm, comme les alcaloïdes antitumoraux de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) ou le taxol de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*), à plus de 15% pour les écorces du quinquina (*Cinchona ledgeriana*) (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes tropaniques font partie des plus vieux remèdes utilisés en médecine. Des plaques d'argiles assyriennes vieilles de plus de 4000 ans mentionnent une liste de 250 plantes parmi lesquelles se trouve *Atropa belladonna*. A quelques exceptions près, ce sont des esters d'alcools tropaniques et d'acides de structures variables. Ils ont en commun un élément structural bicyclique azoté, l'azabicyclo[3,2,1] octane appelé noyau tropanique. Selon la nomenclature IUPAC, ce sont des 8-méthyl-8-azabicyclo[3,2,1] octanes. On recense environ 200 alcaloïdes dans ce groupe, répartis dans un petit nombre de familles d'Angiospermes. Ces alcaloïdes sont présents surtout chez les Solanacées mais on peut les trouver également chez les *Convolvulaceae*, les *Erythroxylaceae*, les *Proteaceae* et les *Rhizophoraceae*. Ils sont très

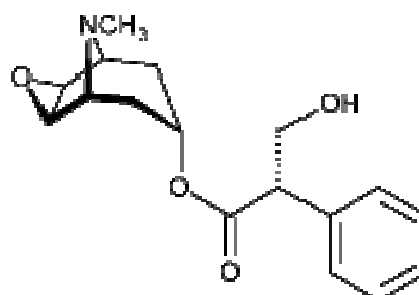
rarement présents dans d'autres familles n'ayant aucune relation taxonomique avec les *Solanaceae*, comme les *Brassicaceae*, les *Euphorbiaceae* et les *Olacaceae* (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes ont longtemps été considérés comme des produits terminaux de voies de biosynthèse, mais de plus en plus, cette affirmation tend à être réfutée. Des expériences chez le lupin ont montré que, pour les alcaloïdes quinolizidines, l'azote provenant de ces molécules pouvait aussi être utilisé par la plante lors qu'elle présente des déficits graves en cet atome. De plus, la conversion des alcaloïdes hydroxylés chez cette même plante en esters de type tygloyl ou cinnamoyl a été bien caractérisée (Wink, 1998b) : les alcaloïdes sont donc loin d'être des molécules internes et terminales.

L'hyoscyamine et la scopolamine appartiennent à la famille des alcaloïdes tropaniques. Elles sont définies par la présence d'un noyau tropane hérité de la tropinone, qui porte le noyau azoté et d'un noyau benzène hérité de la phénylalanine (planche 1). Elles ne sont retrouvées que chez certaines espèces de Solanacées (Gontier, 1993).



Hyoscyamine
Formule : $C_{17}H_{23}NO_3$
Masse de Mol : 289,4g



Scopolamine
Formule : $C_{17}H_{21}NO_4$
Masse de Mol : 303,4g

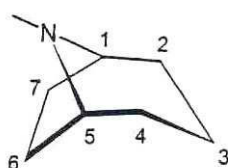


Planche 1: Structure de la molécule d'hyoscyamine, de scopolamine et du noyau tropanique.

D'un point de vue pharmacologique, l'hyoscyamine et la scopolamine sont des substances d'intérêt majeur de part leur activité parasympholytique. Elles servent également de modèles pour l'obtention de molécules de synthèse analogues. La synthèse organique des alcaloïdes tropaniques est possible. Elle implique cependant de nombreuses étapes.

Récemment, la déprotonation asymétrique de la tropanone a permis la synthèse énantiosélective de plusieurs alcaloïdes (O'Hagan, 2000).

I-3.2 Biosynthèse des alcaloïdes tropaniques

A partir des années 50, les travaux de Leete (1960) ont permis de définir les grandes lignes de la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques. Ces études furent réalisées sur la plante entière avec des isotopes marqués. La voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques est désormais l'une des mieux connues parmi celles des métabolites secondaires. Malgré d'intenses recherches, la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques n'est cependant pas encore totalement comprise, particulièrement au niveau enzymatique et moléculaire.

Les alcaloïdes tropaniques, dont l'hyoscyamine et la scopolamine, sont synthétisés par certaines plantes de la famille des Solanacées comme atropa, datura, duboisia et hyoscyamus. Selon certains auteurs, les principales voies de biosynthèse de l'hyoscyamine et de la scopolamine sont bien connues (Robins *et al.*, 1990 ; 1991a ; Robins, 1998) (planche 2). Le noyau tropane bicyclique est formé à partir de l'ornithine et/ou de l'arginine *via* la tropanone, tandis que le groupement acide tropique est synthétisé à partir de la phénylalanine (Lanoue *et al.*, 2002). L'hyoscyamine et la scopolamine sont issues du cycle des polyamines (arginine, ornithine, méthionine et phénylalanine). Le processus de synthèse de l'hyoscyamine se fait essentiellement au niveau des racines de la plante (Waller et Novacki, 1978 ; Nakanishi, 2000). Une partie est ensuite transportée vers les parties aériennes et l'autre est transformée en scopolamine au cours de la translocation (Gontier, 1993 ; Lanoue *et al.*, 2002).

La voie de biosynthèse de la scopolamine, étudiée par de nombreux auteurs, est complexe. Elle fait intervenir plusieurs précurseurs et enzymes différents (Boitel-Conti *et al.*, 2000 ; Robins, 1998 ; Zabetakis *et al.*, 1998). Selon Gontier *et al.* (1994), l'hyoscyamine est synthétisée dans la racine par l'estérification du tropanol et de l'acide tropique (hypothèse par la suite remise en cause par Lanoue *et al.*, (2002). L'acide tropique est dérivé de la phénylalanine et le tropanol est issu du tropinone et de l'hygrine. Sous l'action de l'enzyme hyoscyamine-6 β -hydroxylase (H6H EC 1.14.11.11), elle va être convertie en scopolamine (Hashimoto *et al.*, 1991).

Nakanishi *et al.* (2000) ont aussi montré que les racines, lieu de production des alcaloïdes tropaniques, sont constituées de plusieurs types de tissus, dont les caractéristiques changent suivant les différentes phases de développement et les conditions de croissance. Par

ailleurs, d'autres études récentes ont démontré que les enzymes entrant dans la biosynthèse de ces alcaloïdes se trouvent dans des tissus particuliers comme le péricycle, l'endoderme et/ou autre cortex (Nakajima et Hashimoto, 1999).

Pour Suzuki (Suzuki *et al.*, 1999a, 1999b), cité par Nakanishi (2000), le site principale de production des alcaloïdes tropaniques devrait être le péricycle des jeunes racines, et ce, parce que les enzymes essentielles des voies de biosynthèse, la putrescine N-methyltransferase (PMT EC 2.1.1.53) et la H6H, s'y trouvent.

Le groupement aromatique de l'hyoscyamine est constitué par l'acide tropique. Cependant, il est maintenant établi que la molécule d'acide tropique, elle-même, n'est pas un intermédiaire de la voie de biosynthèse. Il est connu depuis longtemps que la phénylalanine est le précurseur du groupement acide tropique de l'hyoscyamine (Leete, 1960). Des expériences de marquage avec de la phényl[1,3-¹³C₂]alanine sur des plantes entières de *Datura innoxia* ont montré que la conversion de la phénylalanine en hyoscyamine et scopolamine impliquait un réarrangement intramoléculaire (Leete *et al.*, 1975, Lanoue, 2003). Le processus de réarrangement a été démontré dans les racines transformées de *Datura stramonium* et de *Datura candida* x *Datura aurea* (Robins *et al.*, 1994) en utilisant de l'acide phényl[1,3-¹³C₂]lactique. L'examen des spectres RMN de l'hyoscyamine et de la scopolamine montre l'apparition de couplage spin-spin indiquant la présence de deux carbones marqués voisins. Ces expériences ont montré que l'acide phényllactique est le précurseur de l'hyoscyamine et non l'acide tropique et donc que le réarrangement a lieu après l'estérification. Ainsi la littorine, l'ester phényllactoyl de la 3 α -tropanol est supposée être le précurseur de l'hyoscyamine. La synthèse directe de l'hyoscyamine à partir de la littorine a été démontrée en ajoutant du 3 α -(RS)-phényl[1,3-¹³C₂]lactoyl[méthyl-²H₃]tropanol (littorine) à des cultures de racines transformées de *Datura stramonium*. Il est probable que l'estérification implique l'activation de l'acide phényllactique pour former du phényllactoyl-CoA.

L'hydroxylation de l'hyoscyamine en 6 β -hydroxyhyoscyamine suivie d'une époxydation mène à la formation de la scopolamine. L'enzyme qui catalyse les deux réactions successives d'hydroxylation et d'époxydation a été purifiée par Hashimoto *et al.*, (1986). Il s'agit de l'hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H). Il a été démontré que l'activité hydroxylase de l'H6H est 40 fois plus forte que l'activité époxydase (Hashimoto *et al.*, 1993). Malgré cela, dans la majorité des cas, la 6 β -hydroxyhyoscyamine ne s'accumule pas dans les plantes produisant de la scopolamine.

I-3.3 *Datura innoxia* Mill., origine et description de la plante

Les daturas sont des angiospermes de la classe dicotylédones, appartenant à la famille des Solanacées. Ils regroupent des espèces herbacées, arbustives ou arborescentes qui peuvent être annuelles ou pérennes. Les différentes espèces de daturas sont autogames, et la plante diploïde possède 24 chromosomes somatiques ($2n=24$) (Palomino *et al.*, 1988). Ils sont répandus dans l'ancien et le nouveau monde, dans des zones chaudes et tempérées. Ce sont des plantes riches en alcaloïdes dans tous leurs organes, ce qui les rend vénéneuses et très toxiques.

Le genre *Datura* est composé de plusieurs espèces. Les plus importantes du point de vue biologiques ou économiques sont *D. alba*, *D. arborea*, *D. candida*, *D. discolor*, *D. fastuosa*, *D. fatuosa*, *D. ferox*, *D. inermis*, *D. innoxia*, *D. kymatocarpa*, *D. leichhardtii*, *D. metel*, *D. meteloides*, *D. pruinosa*, *D. reburra*, *D. sanguinea*, *D. stramonium*, *D. suaveolens* et *D. wrightii* (Bajaj, 1999).

Les daturas sont utilisés comme plantes médicinales ou ornementales. Ils se multiplient par bouturage ou par semis.

Le *Datura innoxia* Mill., notre plante étudiée (planche 3), est une herbacée annuelle poussant en région chaude - en Inde et en Amérique du Sud - (Drake *et al.*, 1996), et tous ses organes contiennent deux principaux alcaloïdes tropaniques : l'hyoscyamine et la scopolamine. La hauteur moyenne de *Datura innoxia* est de 50cm, et peut atteindre 2m. Ses feuilles sont fortement dissymétriques, à bords légèrement dentés. La plante développe environ 11 à 12 feuilles avant d'atteindre la phase de floraison (Tran, 2005). Elle a des fleurs en forme de trompette, isolées, blanches mesurant environ 15 à 20cm. Le fruit est une capsule ovoïde couverte d'épines piquantes et divisé en trois carpelles contenant chacun une centaine de graines (de 100 à 300 graines par fruit). Le poids de 1000 graines est $12,2 \pm 0,003g$. Les racines ont une forme fasciculée et très ramifiée.

Il s'agit d'une plante modèle pour les recherches menées sur la production de métabolites secondaires, car tous ses organes contiennent de l'hyoscyamine et de la scopolamine, deux composés importants pour l'industrie pharmaceutique. Au niveau de la recherche agronomique, il peut s'agir également d'une bonne plante modèle car des expériences de courte durée sont suffisantes pour décrire le comportement végétal à tous ses stades culturaux. *Datura innoxia* est autogame et produit de nombreuses graines faciles à manipuler à chaque cycle. Ainsi, le renouvellement du matériel végétal de même que le

maintien de la stabilité génétique est aisé. De plus, cette espèce est parfaitement adaptée à la culture en hydroponie (Gontier *et al.*, 2002 ; Tran, 2005). Le *Datura innoxia* a donc été choisi comme support principal dans nos propres travaux de recherche.



A: *Datura innoxia* Mill.



B: Bouton floral et fleur



C: Fruit mûr et graines



D: Racines

Planche 3: *Datura innoxia* Mill. (A) et ses organes : bouton floral et fleur (B); fruit et graines (C); racines (D).

I-3.4 Variation de la concentration et de la nature des alcaloïdes tropaniques au sein de la plante entière

La quantité et la nature des alcaloïdes tropaniques varient suivant l'âge et l'origine de la plante (Yankoulov, 1979). L'ensemble des variations qualitatives et quantitatives observées peut être exploité pour la sélection de variants surproducteurs (Herouart *et al.*, 1988, 1991 ; Parr *et al.*, 1988, 1990).

I-3.4.1 Variation de la teneur en H&S selon l'organe

Comme nous l'avons entraperçu, les lieux de synthèse des alcaloïdes dans la plante sont assez bien connus. Waller et Novacki (1978) ont montré que les racines étaient le site principal de synthèse de H&S chez *Datura innoxia*. Verzar-Petri (1973) décrivait des cristaux semblant correspondre à des alcaloïdes dans le parenchyme racinaire chez le *Datura*. Les études alors menées à l'aide de colorants (réactif de Dragendorf) ou d'atropine marquée radioactivement, ont également montré la présence d'alcaloïdes dans les poils sécréteurs à la surface supérieure des limbes.

La réaction d'époxydation de l'hyoscyamine en scopolamine a lieu dans toute la plante, mais elle est très faible dans les racines et forte dans les tiges et les feuilles (Romeike, 1959, 1961). Hashimoto *et al.* (1991) ont montré, au contraire, que l'activité de H6H (EC 1.14.11.11) se situait dans les racines, au niveau des cellules du péricycle chez *Hyoscyamus niger*.

Chez le *datura*, le taux d'hyoscyamine est supérieur au taux de scopolamine dans les racines. Ce rapport s'inverse dans les tiges et plus dans feuilles (Robinson, 1981), en particulier, le contenu maximum en scopolamine est observé dans les feuilles apicales (Miraldi *et al.*, 2001). Le taux d'alcaloïdes dans la plante est donc lié à la synthèse de l'hyoscyamine dans les racines (Romeike, 1961), à la migration des alcaloïdes au sein de la plante et à leur dégradation (Kitamura *et al.*, 1988).

Les racines contiennent en général, plus d'alcaloïdes que les feuilles. La concentration mesurée dans les racines est d'autant plus forte que leur diamètre est faible (Plank et Wagner, 1986). Les teneurs dans la corolle et dans le gynécée sont plus faibles (Szoke *et al.*, 1982 ; Desailly *et al.*, 1988).

Au niveau subcellulaire, Desailly *et al.* (1988) ont montré une plus forte concentration alcaloïdique dans les chloroplastes que dans le reste de la cellule.

Egalement, de nombreuses recherches visant à affiner les connaissances sur la biosynthèse du tropinone ont permis à Landgrebe et Leete (1990), entre autres, d'éclairer encore un peu plus le métabolisme racinaire de ce composé intermédiaire.

Par ailleurs, la concentration des alcaloïdes varie considérablement au cours du cycle journalier (Raven *et al.*, 2000). Ce phénomène a été observé chez *Atropa belladonna* (Sporer *et al.*, 1993). Dans les parties vertes de la plante, les alcaloïdes sont accumulés en grandes

quantités le soir (entre 18 et 21 heures) et en début de la matinée (entre 6 et 9 heures). La plus faible concentration se situe autour de midi et en pleine nuit (vers 3 heures du matin). Il existe aussi des variations journalières d'accumulation d'hyoscyamine dans le grain. Le maxima est atteint vers 18 heures et les taux sont au minimum dans le courant de la nuit (Sporer *et al.*, 1993). Wink et Witte (1984) ont aussi relevé ces phénomènes pour les alcaloïdes quinolizidines.

I-3.4.2 Variation de la teneur en H&S selon le stade de développement de la plante

Le taux d'alcaloïdes mesuré est variable en fonction du stade de développement de la plante (Kitamura *et al.*, 1988). Ce taux augmente avec l'âge de la plante pour être maximal chez une plante cultivée avec une photopériode de 16 heures, lorsque le premier bouton floral atteint 1 cm de longueur (Cosson, 1976). Chez *Hyoscyamus muticus*, la teneur alcaloïdique foliaire maximale est atteinte pendant la floraison (Oksman-Caldentey *et al.*, 1987) alors que dans les racines, la concentration en hyoscyamine continue d'augmenter jusqu'à la mise à graine.

Parallèlement, on trouve des quantités plus importantes d'alcaloïdes chez les jeunes feuilles que chez les plus vieilles (Cosson, 1976 ; Verzar-Petri et Huynh, 1977 ; Cougoul *et al.*, 1979 ; Duez *et al.*, 1985 ; Gontier, 1988).

Au cours de la croissance et du développement de la plante, l'anabolisme ainsi que le catabolisme sont sujets à des évolutions (Cosson *et al.*, 1978 ; Bouami-Guenoumi *et al.*, 1990).

I-3.4.3 Variation de la teneur en H&S selon l'origine de la plante et ses conditions culturales

Le taux d'alcaloïdes est variable selon les conditions culturales de la plante. Ainsi, Cosson (1972, 1976) et Cosson *et al.*, (1978) ont rapporté que les conditions écophysiologicals ont une grande importance quant à la productivité des plantes. Des daturas cultivés avec une photopériode de 16 heures et une intensité d'éclairement de 18 000 lux produisent un maximum d'alcaloïdes tropiques.

Le traitement des plantes, et/ou cellules-tissus *in vitro*, par différents composés peut également accroître la teneur alcaloïdique. A titre d'exemple nous citerons : la salinisation,

l'acide ascorbique (Pundarikashudu et Bhasvar, 1989), les auxines (Sinha et Varma, 1974 ; Van de Velde, 1988), les giberellines (Hara *et al.*, 1988) ou encore la balance ionique (Demeyer *et al.*, 1989a, 1989b).

Une plante issue de culture *in vitro* ne présentera pas obligatoirement le même profil alcaloïdique qu'une plante issue de germination (Herouart *et al.*, 1988).

I-3.5. Utilisations anciennes et modernes des daturas

Depuis de temps immémoriaux, diverses espèces de datura productrices d'alcaloïdes sont utilisées comme plantes sacrées aux propriétés psychotropes. *Datura metel* constituait une plante sacrée associée aux rituels religieux de la Chine et de l'Inde et était connu également dans la Grèce antique. *Datura ferox* était utilisée comme plante médicinale et comme hallucinogène en Afrique. On savait que le daturas et les autres Solanacées constituaient également un des principaux ingrédients des potions et des baumes destinés à emmener au sabbat les sorcières du Moyen Âge dont plusieurs recettes sont parvenues jusqu'à nous (Bruneton, 1996).

Les genres de datura contiennent l'hyoscyamine et la scopolamine. Ces molécules agissent sur les récepteurs muscariniques (noradrénaline, sérotonine et dopamine) du signal nerveux, dont le neurotransmetteur est l'acétylcholine. Elles ont une structure similaire à cette dernière et provoquent donc une compétition avec le neurotransmetteur pour fixation sur le récepteur (Wink, 1998b). Ces molécules entrent donc dans la composition de médicaments pour leurs propriétés mydriatiques, parasympatholytiques, spasmolytiques et antisécrétoires.

Les alcaloïdes tropaniques montrent une activité antimuscarinique. L'utilisation principale de la scopolamine est la prévention des maux de transports (cinépathie). Un patch délivre progressivement 0,5 mg de scopolamine en 72 heures. L'hyoscyamine et la scopolamine, représentants majeurs de la famille des alcaloïdes tropaniques (Leete, 1963, 1990 ; Hashimoto *et al.*, 1982, 1991), possèdent des propriétés neurosédatives et antispasmodiques. L'hyoscyamine et la scopolamine peuvent induire des effets secondaires comme la sécheresse de la bouche, des troubles de la vision et la somnolence. Les doses toxiques généralement admises pour un adulte sont de 5 mg d'atropine et 4 mg de scopolamine (Lanoue, 2003). De nombreux analogues synthétiques et hémisynthétiques ont été élaborés et possèdent les mêmes indications thérapeutiques. Ils sont utilisés dans le

traitement de l'asthme et des bronchospasmes comme bronchodilatateurs et également pour soulager les spasmes interstinaux.

L'hyoscyamine inhibe de façon compétitive et réversible la fixation de l'acétylcholine sur ces récepteurs et entraîne une élévation du rythme cardiaque, un ralentissement de l'activité de l'appareil urinaire et des intestins, une réduction de l'ensemble des sécrétions (salivaire, gastrique, bronchique...), une mydriase (Schmeller et Wink, 1998). Les indications thérapeutiques d'hyoscyamine sont assez restreintes.

La scopolamine a une action parasympholytique moins marquée que l'hyoscyamine. Mais, elle possède une activité biologique supérieure à celle de l'hyoscyamine et présente un peu moins d'effets secondaires. Ainsi, elle a des propriétés antispasmodiques, sédatives et antiparkinsoniennes. Elle est principalement utilisée comme antinaupathique (Dorsz, 2005) et dans le traitement de la maladie de Parkinson. Elle est aussi présente dans des spécialités analgésiques, en association avec la morphine et la spartéine ou associée à l'extrait d'opium et la procaïne.

Pour compléter la mise en place des données essentielles nécessaires au développement de ce mémoire, il nous paraît indispensable d'évoquer les techniques et méthodes relevant de l'agronomie et plus particulièrement des cultures hydroponiques et aéroponiques. La partie suivante va donc présenter les techniques de culture hors sol largement développées et utilisées dans les domaines du maraîchage, de la floriculture et en pépinière.

I-4 Les cultures végétales hors sol

Cette technique culturale s'est développée à partir des recherches sur la physiologie de la nutrition minérale pour les végétaux. Knop et Sachs (Cooper, 1979) ont réussi indépendamment à faire pousser des plantes sur des milieux entièrement liquides constitués d'eau additionnée de sels minéraux (macroéléments et oligoéléments) dès 1860. Plus tard, pendant la seconde guerre mondiale, l'armée des Etats Unis d'Amérique a mis en œuvre ces connaissances en vue de produire des fruits et légumes pour ses soldats dans les îles du Pacifique (Morard, 1995). Depuis, les techniques de cultures hors sol se sont très largement développées.

Si on exclut les cultures sur substrats (cap-irrigation / sub-irrigation), on peut dire qu'il existe deux principaux types de culture hors sol (Morard, 1995): l'hydroponie et l'aéroponie.

I-4.1 Cultures hydroponiques

Pour l'hydroponie, les racines des plantes sont en contact avec un milieu liquide, la solution nutritive. Si cette dernière est non circulante, on parle d'aquiculture. Typiquement, les racines trempent dans un bac et, pour éviter une asphyxie partielle, il est nécessaire de fournir de l'air par bullage dans la solution nutritive (planche 4).

Pour éviter les problèmes techniques liés à l'aération de la solution nutritive, une technique d'immersion partielle des racines peut aussi être réalisée. Dans ce cas, la racine plonge dans la solution nutritive avec une faible épaisseur de 2 à 3 cm. La partie racinaire située au dessus de l'eau assure la respiration des plantes.

Cette technique consiste à nourrir les racines des plantes qui se trouvent dans du substrat (laine de roche, par exemple) ou bien dans une solution nutritive. Elle permet à la plante d'avoir un meilleur accès à l'oxygène, à l'eau, ainsi qu'à la nourriture. Le contrôle du pH de la solution ainsi que son électroconductivité permettent de gérer le milieu par rapport aux besoins de chaque plante, et à chaque des stades de leur vie. Grâce à ce principe, la plante est poussée au maximum de son potentiel génétique et elle produira de plus grosses fleurs, de plus gros fruits et, dans le cas des plantes médicinales, celles-ci pourront voir une forte augmentation de leur production en principe actif.

Il existe aussi un autre système qui consiste à cultiver les plantes sur un film de solution nutritive. Cette technique est appelée NFT pour Nutrimment Film Technique. Dans ce cas, les racines sont alimentées à l'aide d'une solution nutritive circulante. La circulation du milieu nutritif assure une bonne oxygénation des racines. Les racines sont disposées dans une gouttière légèrement inclinée à 1 ou 2%. La solution nutritive arrive à l'extrémité la plus élevée de la gouttière, s'écoule et, les excédents sont récupérés à sa partie basse. Ils sont collectés dans un bac, puis de nouveau recyclés en tête de l'installation.

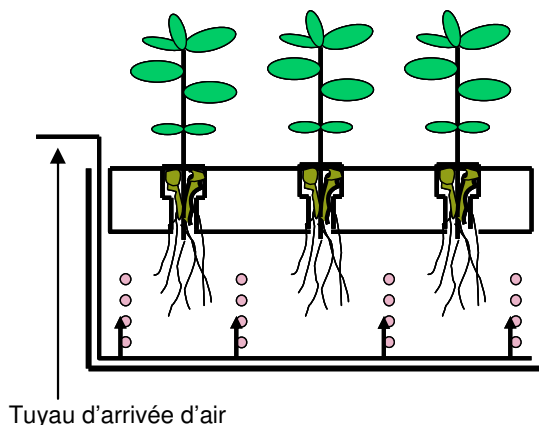


Planche 4 : Schéma de culture hydroponique non stérile en bac et en pilote (repris de Tran, 2005).

I-4.2 Cultures aéroponique

Pour obtenir une bonne croissance des plantes grâce à une bonne oxygénation des racines, une autre technique a été développée par Cooper (cité dans Morard, 1995). Il s'agit de l'aéroponie (planche 5).

Dans cette méthode, les racines sont alimentées par un brouillard nutritif dans une enceinte close. Ce système assure une excellente aération. La pulvérisation peut être continue ou intermittente par cycles d'un quart d'heure ou d'une demi-heure avec des arrêts de quelques minutes pendant la journée, et beaucoup plus long pendant la nuit. Cette culture est coûteuse, et est souvent limitée à la recherche, et surtout aux études relatives au système racinaire. Ainsi dans notre laboratoire, du blé a été cultivé en système aéroponique afin d'étudier l'effet de régulateurs de croissance chez cette céréale (effet antiverse: longueur des pailles, des entre-nœuds de la base, effet rhizogène). Lors des premiers stades (tallage, début épiaison), un très important accroissement de la biomasse racinaire des plantes a pu être observé grâce au dispositif aéroponique (Guckert *et al.*, 1987 ; Kratsch *et al.*, 2006).



Planche 5 : Schéma de culture aéroponique (repris de Tran, 2005) et les racines de *Datura innoxia* cultivées dans ce système.

I-4.3 Procédé « Plantes à Traire »

Le Laboratoire Agronomie et Environnement de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires développe depuis 1996 un système innovant de production de principes actifs d'origine végétale, dénommé « Plantes à Traire » (système PAT). Celui-ci met en jeu la culture de plantes en système hors-sol puis une libération

naturelle ou forcée des molécules d'intérêt dans le milieu nutritif et, enfin, le piégeage de ces dites molécules (Gontier *et al.*, Brevet FR 99 14204, 1999). Ces travaux sont issus de l'expérience antérieure accumulée à la fois par le Laboratoire Agronomie et Environnement (ENSAIA-INRA Nancy) et le Laboratoire Androgénèse et Biotechnologie - UPJV (Amiens).

Cette technologie consiste à cultiver des plantes en hydroponie et à leur faire excréter, via les racines, les molécules d'intérêt dans la solution nutritive à l'aide ou non de traitements physiques ou chimiques sans perte de viabilité des plantes. Les métabolites relarguées par les racines sont ensuite piégés et extraits du milieu. Le traitement est non destructif, le cycle de production peut être répété par des « traites » successives associées à un recyclage du milieu.

Le procédé « Plantes à Traire » s'appuie en premier lieu sur la culture des plantes en hors-sol. Ce système de culture semble pouvoir être utilisé pour un très grand nombre d'espèces végétales, avec, dans de nombreux cas, une amélioration de la croissance en comparaison avec des témoins en terre lorsque les différents paramètres de culture sont optimisés. De plus, plusieurs chercheurs ont pu mettre en évidence que le contenu en métabolites secondaires des plantes cultivées en système hors-sol pouvait être modifié, à la fois quantitativement et qualitativement (Gontier *et al.*, 2002 ; Pedneault *et al.*, 2002 ; Tran, 2005).

I-4.4. Intérêts et utilisations des cultures hors sol

La culture hors sol a remplacé progressivement la culture traditionnelle d'un certain nombre de légumes dans le monde. Cette technique est appliquée largement à l'horticulture (maraîchage, floriculture et pépinière). L'évolution de surface cultivée est très importante par rapport au début des années 80. En effet, en une vingtaine d'années, les surfaces ont été multipliées par 20. Cette progression est régulière puisque, durant la période 1992-2002, la surface mondiale a presque triplé. Le développement de cette technologie s'est essentiellement effectué en Europe qui concentre depuis 1982 environ 80% des surfaces cultivées en hors sol. En 2002, l'union européenne compte environ 8 000 ha, dont approximativement 1 600 ha en France de culture légumière hors sol (Jeannequin *et al.*, 2005), essentiellement des tomates, concombres, poivrons et fraises.

La principale raison de ce développement est la possibilité d'éviter certains problèmes liés au sol comme des agents pathogènes ou des sols non arables (déserts sableux, sols argileux, sols salés...). D'autre part, cette culture permet l'économie d'eau et d'engrais

minéraux (grâce au système de recyclage), la simplification de techniques culturales (pas de désherbage, préparation de la terre...), et l'obtention de produits de meilleure qualité (produits plus "propres" car jamais souillés de terre et moins de résidus de pesticides (Morard, 1995). L'autre avantage non dit consiste à pouvoir être en mesure de produire des légumes en super primeur ce qui débouche sur un prix de vente plus élevé et une meilleure marge.

Les avantages de ce procédé expliquent peut-être son développement. En effet, par rapport à la culture en sol, la croissance des plantes est plus rapide, les besoins en eau inférieurs, les détériorations des cultures par nuisibles (ou autres), limitées. La culture hors sol permet également de cultiver différentes plantes au même endroit, sans préparation spéciale de la terre. Le travail est simplifié. D'un point de vue qualité du produit cultivé, notons l'aspect esthétique amélioré, la conservation du produit plus longue et l'utilisation moindre d'insecticides ou autres produits phytosanitaires. La culture hydroponique permet également une automatisation de la culture : température, éclairage, contrôle du pH et de la concentration en éléments nutritifs du liquide, ventilation.

L'adoption et le développement de ces types de cultures en agriculture industrielle, malgré leur grand potentiel, sont limités à cause de l'importance des capitaux qu'il faut investir pour qu'elles soient mises en place. De plus, elles engendrent des dépenses électriques plus importantes, ce qui freine encore de nombreux agriculteurs à les installer.

En dehors de l'application à l'horticulture, les cultures hors sol ont été utilisées en vue d'objectifs de recherche. Ainsi les études sur les systèmes racinaires étant parfois difficiles à réaliser en sol, la culture hydroponique peut permettre de résoudre ce problème, au moins une partie. De tels type d'études ont été conduites par des chercheurs désirant contrôler les paramètres nutritionnels et environnement du système racinaire (Olympios, 1975 ; Guckert *et al.*, 1987, Morard, 1995 ; Kratsch *et al.*, 2006).

I-5 Transformation génétique des végétaux par *Agrobacterium*

Les méthodes de transformation génétique des plantes sont apparues au début des années 80 avec le développement des techniques de biologie moléculaire. Elles ont pour but l'introduction, l'insertion et l'expression de nouveaux caractères dans le génome des cellules végétales par d'autres moyens que la fusion de gamètes (Birch, 1997). Elles constituent maintenant un outil très utilisé, d'une part en recherche fondamentale pour étudier la fonction

et la régulation de l'expression de gènes de plantes, et d'autre part, comme technique au service de l'amélioration des plantes, ou encore à des fins industrielles pour faire produire aux végétaux des substances à haute valeur ajoutée (Daniel *et al.*, 2001 ; Faye *et al.*, 2001).

Le succès en transgénèse végétale nécessite la présence concomitante d'un certain nombre d'acteurs. Selon Hansen et Wright (1999) la transformation requiert :

- ✚ des tissus cibles compétents pour la propagation et la régénération,
- ✚ une méthode efficace de transfert d'ADN,
- ✚ des agents de sélection des tissus transgéniques,
- ✚ la capacité à recouvrir des plantes transgéniques fertiles avec une fréquence correcte,
- ✚ un procédé de transformation simple, efficace, reproductible, indépendant du génotype.

Il existe différents types de transfert de gènes : les méthodes directes et les méthodes indirectes.

Les méthodes indirectes utilisent des agents pathogènes tels que les virus ou les bactéries. Les vecteurs les plus souvent utilisés sont les agrobactéries : *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes*.

Agrobacterium est une bactérie du sol, bacille Gram négatif, aérobic strict, de la famille des Rhizobiaceae (Kertters et DeLey, 1984). Cette famille se divise en deux genres : le genre *Rhizobium* et le genre *Agrobacterium*.

Le genre *Rhizobium* a la capacité d'établir une relation symbiotique avec différentes espèces végétales. La bactérie apporte à la plante la nitrogénase, enzyme qui permet la fixation de l'azote atmosphérique fournissant ainsi l'azote réduit nécessaire à la croissance de la plante. En échange, cette dernière procure à la bactérie qu'elle héberge l'énergie nécessaire à sa croissance.

Le genre *Agrobacterium* (A.) est pathogène pour certaines plantes chez lesquelles il induit d'importantes modifications phénotypiques. *A. tumefaciens* (Smith et Townsend, 1907) provoque la maladie de la galle du collet ou « crown gall », qui se traduit par la formation de tumeurs indifférenciées caractéristiques. En 1930, des études ont montré que la bactérie *A. rhizogenes* était responsable de la maladie du chevelu racinaire ou « hairy root » qui provoque la différenciation de chevelus racinaires caractéristiques, au niveau de sites d'infection (Riker

et al., 1930). Les tissus ainsi formés (chevelus racinaires) sont les conséquences de la transformation génétique de cellules normales en cellules à prolifération active (Hooykaas et Shilperoort, 1992). Ces tissus peuvent être cultivés *in vitro* et possèdent deux caractéristiques :

- ✓ la première est qu'ils peuvent se développer en l'absence de facteurs de croissance exogènes car les cellules qui les constituent ont acquis le pouvoir de synthétiser leurs propres phytohormones (auxines et cytokinines).
- ✓ la seconde caractéristique est qu'ils produisent et excrètent des dérivés d'acides aminés particuliers appelés opines qui sont spécifiques de la souche bactérienne inductrice, qui les utilise comme source de carbone (Petit *et al.*, 1983 ; Dessaux *et al.*, 1993).

I-5.1 Organisation des plasmides pTi et pRi d'*Agrobacterium*

Le principal élément pathogène de la bactérie *Agrobacterium* est un plasmide de haut poids moléculaire (~ 200 kb), appelé plasmide Ti (pTi : tumor-inducing) chez *A. tumefaciens* et plasmide Ri (pRi : Root-inducing) chez *A. rhizogenes*. Le nom donné au plasmide reflète le symptôme de la maladie : formation de tumeurs indifférenciées chez *A. tumefaciens*, et apparition d'un important chevelu racinaire au point d'infection avec *A. rhizogenes* (Zambryski *et al.*, 1989 ; Gaudin *et al.*, 1994 ; Bonhomme *et al.*, 2000a et 2000b). Si ce plasmide est transféré dans une souche non virulente d'agrobactéries ou de bactéries génétiquement proches telles *Rhizobium trifolii* (qui induit la formation de nodules racinaires), celles-ci deviennent à leur tour capable d'infecter les cellules végétales (Chilton *et al.*, 1977 ; Hooykaas *et al.*, 1977). Néanmoins, la seule présence de ce plasmide ne suffit pas puisque son transfert dans une souche bactérienne comme *Escherichia coli* ne la rend pas virulente. Il y a donc des particularités au sein du même génome d'*Agrobacterium* qui la rendent capable d'infecter des cellules végétales.

Les plasmides Ti et Ri d'*Agrobacterium* sont connus de manière assez précise et portent cinq domaines importants (Hille *et al.*, 1984) :

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

- ✚ les gènes qui assurent le transfert du plasmide par conjugaison vers d'autres bactéries ;
- ✚ les gènes responsables du catabolisme des opines (*opc*) ;
- ✚ la région de virulence (*vir*) qui permet le transfert et l'excision de l'ADN-T. Elle regroupe huit gènes. Seuls *vir A* et *vir G* ont l'expression constitutive. Les autres gènes ne sont induits que lorsque la bactérie est en présence d'une plante qui lui est compatible et dont les cellules libèrent des composés phénoliques inducteurs comme l'acétosyringone (Zambryski, 1992) ;
- ✚ l'ADN-T est la séquence transmise par l'agrobactérie à la cellule végétale. Il est délimité par deux séquences de 25 pb appelées RB (Right Border – Bordure droite) et LB (Left Border – Bordure gauche). Le transfert de l'ADN-T est polarisé. Il s'effectue de la droite vers la gauche et seule la bordure droite est indispensable au transfert. L'ADN-T renferme deux types de gènes, les oncogènes (*onc*) et les gènes de synthèse des opines (*ops*).

I-5.1.1 Les oncogènes

Les oncogènes (*onc*) confèrent les phénotypes transformés « crown gall » pour le plasmide pTi et « hairy root » pour le plasmide pRi (Hooykaas et Shilperoort, 1992 ; Zambryski, 1992). Les oncogènes du plasmide pTi sont des gènes de biosynthèse des phytorégulateurs. On distingue les gènes *tms-1* et *tms-2* qui codent pour les deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse d'une auxine : l'acide indole acétique (AIA) et le gène *ipt* qui code pour une isopentényl transférase impliquée dans la synthèse d'une cytokine : l'isopentényl-AMP. L'expression de ces gènes entraîne une production anormale de phytorégulateurs qui induit une multiplication active des cellules transformées et des cellules normales voisines par diffusion de substances. Ces substances conduisent à la formation d'un cal (Hooykaas et Shilperoort, 1992). La tumeur ainsi obtenue est un tissu chimérique inorganisé, constitué de cellules transformées et de cellules normales.

Les oncogènes du plasmide pRi comprennent, entre autres, les gènes *tms-1* et *tms-2*. La néoformation des chevelus racinaires n'est pas due à ces gènes *tms*, mais plutôt à l'expression de quatre autres gènes (*rol A*, *rol B*, *rol C* et *rol D* – root loci) (Cardarelli *et al.*, 1987a, b). Ces gènes induisent une sensibilité accrue des cellules transformées à l'auxine endogène (Maurel *et al.*, 1991). Contrairement aux tumeurs de la maladie de la galle du collet, chaque racine du

chevelu racinaire a une origine unicellulaire et constitue donc un clone dont toutes les cellules sont issues d'un événement unique de transformation. La possibilité d'obtenir de tels clones non chimériques présente un intérêt non négligeable pour la production de métabolites secondaires.

I-5.1.2 Les gènes de synthèse des opines (*ops*)

Les opines sont des médiateurs trophiques de la relation hôte-parasite, utilisés par *Agrobacterium* comme substrats de croissance carbonés et azotés (Tempé et Goldmann, 1982 ; Dessaux *et al.*, 1993). Les opines synthétisées sont uniquement métabolisables par l'agrobactérie qui héberge le plasmide et qui possède l'équipement enzymatique nécessaire au catabolisme de ces substances. Ceci permet donc à la souche virulente de favoriser sa propre multiplication (Petit *et al.*, 1983). Les agrobactéries sont des parasites qui utilisent le transfert de gènes pour se créer une niche écologique. Les différentes opines produites et excrétées par les cellules végétales transformées sont caractéristiques de divers types de plasmides et donc des différentes souches bactériennes (Petit *et al.*, 1970 ; Petit *et al.*, 1983 ; Dessaux *et al.*, 1993).

I-5.2 Les vecteurs dérivés du plasmide pTi et pRi d'*Agrobacterium*

Dès les années 70, les chercheurs ont imaginé d'utiliser ces systèmes naturels de transfert et d'intégration, afin d'introduire de nouveaux gènes dans les végétaux. L'idée était d'utiliser le plasmide pTi et pRi comme vecteur de gènes, tout en conservant les gènes essentiels au transfert et à l'intégration de l'ADN-T (région *vir*) mais, en éliminant la région des oncogènes, on obtient alors des plasmides dits désarmés. Les gènes étrangers que l'on désire introduire dans le génome végétal sont alors substitués aux oncogènes. Selon Freyssinet *et al.*, (1993), ces gènes peuvent être de trois types :

I-5.2.1 Gène de sélection

Il confère une résistance à des agents chimiques, comme des antibiotiques ou des herbicides. Le taux de transformation des plantes est généralement très faible, c'est pourquoi des marqueurs de sélection sont utilisés pour assurer le suivi des cellules transformées sur un milieu sélectif et inhiber la régénération de cellules non transformées. Une plante transformée

avec un gène permettant de métaboliser un composé confère une résistance, ou une capacité à utiliser ce composé, supérieure à celle d'une plante témoin non transformée. Néanmoins, certaines plantes non transformées peuvent résister à la sélection parce que présentant une résistance intrinsèque leur permettant de supporter la dose de l'agent de sélection appliquée. On parle de phénomène d'échappement.

On distingue deux modes de sélection qui seront choisis en fonction du matériel végétal utilisé, car certaines plantes peuvent s'avérer extrêmement résistantes à des composés habituellement utilisés comme agent de sélection. Les méthodes de transformation reposent sur des étapes de sélection où les tissus sont cultivés sur des milieux riches contenant des mélanges complexes de nutriments, vitamines et de régulateurs de croissance (Murashige et Skoog, 1962 ; Gamborg *et al.*, 1968) permettent aux cellules de croître, qu'elles soient transformées ou non.

La sélection négative est basée sur la sensibilité des cellules végétales à certaines substances (souvent antibiotiques et herbicides), qui, ajoutées au milieu de culture, inhibent le développement des cellules non transformées. Cette sensibilité est dépendante de l'espèce végétale et des tissus utilisés. Le gène de sélection peut conférer une résistance par plusieurs mécanisme : soit il code pour une protéine qui permet de détoxifier l'agent de sélection, soit il code pour une protéine mutée, insensible à l'agent de sélection, soit il surexprime un gène, qui permet d'accroître la résistance à l'agent de sélection.

Parmi les gènes permettant d'obtenir une résistance aux antibiotiques, les plus couramment utilisés sont :

- ✚ le gène *nptII* qui code pour la néomycine 3'-O-phosphotransférase et qui confère la résistance aux antibiotiques du type aminoglycoside tels que la kanamycine, la néomycine, le G-418 et la généticine.
- ✚ le gène *hpt* codant pour hygromycine phosphotransférase qui confère la résistance à l'hygromycine.
- ✚ d'autres gènes confèrent la résistance à d'autres antibiotiques tels que le chloramphénicol (Chloramphénicol Acétyl Transférase ou CAT), la gentamicine, la streptomycine.

Depuis quelques années, on utilise la sélection positive qui permet de sélectionner les explants transformés sans tuer celles qui ne le sont pas. La sélection positive est basée sur l'état auxotrophique de la plupart des espèces végétales cultivées *in vitro*. En effet, il leur est

impossible de se développer sans l'ajout de plusieurs substances (hormones, sucres). Cet aspect a été exploité pour mettre au point de nouveaux systèmes de sélection basés sur la complémentation par l'insertion d'un gène dans les cellules permettant à celles-ci de produire une substance essentielle à sa croissance absente du milieu de culture, lui procurant ainsi un avantage métabolique.

I-5.2.2 Gène rapporteur

Le gène rapporteur code pour une enzyme généralement absente des cellules de la plante mère et dont l'activité est aisément détectable dans les cellules transformées. Ce gène est utilisé lors de l'optimisation des protocoles de transformation. L'activité d'un gène rapporteur se traduit par une modification visible de la couleur des explants l'exprimant dans des conditions particulières (présence de substrat, pH, UV). Dans le cas d'analyses précoces de l'état transgénique des explants, il n'est parfois pas certain que les bactéries aient été éliminées. L'expression du gène rapporteur ne peut alors pas être attribuée de manière certaine aux cellules végétales. Pour lever toute ambiguïté, il faut faire des constructions de ces gènes sans site de fixation de ribosome bactérien (Jansen et Gardner, 1989) ou bien insérer un intron dans la séquence codante, par exemple celui de la β -glucuronidase. Ceci permet d'écartier toute possibilité d'expression par la bactérie *Agrobacterium* elle-même (Vancanneyt *et al.*, 1990).

Le gène rapporteur doit être choisi en fonction de la nature du matériel végétal. En effet, certaines plantes ont des activités endogènes qui sont capables de masquer l'expression d'un gène rapporteur.

Après la transformation génétique, on peut distinguer trois cas :

- ✓ les explants ne sont pas transformés mais naturellement résistants à l'agent sélection.
- ✓ l'ADN peut avoir été transféré partiellement et alors le gène de résistance à l'antibiotique est présent mais pas le gène rapporteur (ou en partie).
- ✓ Les deux gènes ont été transférés.

Parmi les gènes rapporteurs les plus utilisés, on peut citer le gène *lac Z* qui code pour l'activité β -galactosidase.

Le gène *gus* code l'enzyme de la β -glucuronidase capable d'hydrolyser certains composés glucuroniques. Cette enzyme, en présence du substrat X-Gluc (acide 5-bromo-4-

chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) conduit à l'apparition d'un produit de couleur bleue (Jefferson, 1987). La β -glucuronidase libère de l'umbelliférone à partir de dérivés umbelliferyl comme le MUG (4-Méthylumbelliféryl β -D-Glucuronide) et permet la mesure de l'activité enzymatique par fluorimétrie.

Le gène *gfp* code la *Green Fluorescent Protein* (GFP - protéine verte fluorescente). Cette protéine de 27 kDa a été isolée de la méduse *Aequora victoria* (Chalfie *et al.*, 1994). Elle devient vert fluorescent quand elle est excitée par des ultraviolets ou de la lumière bleue (Haseloff et Siemering, 1998).

L'utilisation du gène codant la GFP présente de nombreux avantages parce qu'elle ne nécessite pas l'addition de substrat, ni de cofacteur (Heim *et al.*, 1994 ; Haseloff et Siemering, 1998 ; Baranski *et al.*, 2006), et surtout parce qu'elle ne nécessite pas la destruction de l'échantillon étudié, ce qui permet notamment de faire une étude des variations de son expression au sein des mêmes tissus au cours du temps.

Des nombreuses autres protéines fluorescentes semblables à la GFP mais n'émettant pas aux mêmes longueurs d'ondes, sont utilisées comme rapporteur, par exemple : la YFP (Yellow Fluorescent Protein) et la dsRed (protéine tétramérique qui a la propriété d'émettre une fluorescence de couleur rouge) (Brown et Talbot, 2003)

I-5.2.3 Gène d'intérêt

Le gène d'intérêt est celui que l'on désire introduire dans la plante afin de lui faire acquérir un nouveau caractère. Il peut conférer de nouvelles propriétés agronomiques (exemple : résistance à un herbicide, à un insecte ou à un virus) ou permettre la synthèse de nouveaux composés (exemples : métabolites d'intérêt thérapeutique ou protéines recombinantes (anticorps, antigènes ou facteurs sanguins etc. ...)) (Daniel *et al.*, 2001 ; Faye *et al.*, 2001).

Après avoir tenté de présenter les éléments principaux décrivant les acteurs de ce travail de thèse (alcaloïdes tropaniques, *Datura innoxia*, *Agrobacterium*, cultures hors-sol), nous allons pouvoir à présent entrer dans le "coeur" de ce mémoire avec successivement, un chapitre sur matériel et méthodes puis une partie où nous exposerons les résultats.

Partie II

Matériel et Méthodes

II-1 Matériel

II-1.1 Matériel végétal

Les graines de daturas (*Datura innoxia* Mill.), utilisées tout au long de nos travaux ont été produites au sein du laboratoire Agronomie et Environnement à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (INPL-INRA) depuis quelques années en serre. Cette lignée a été initialement fournie par le Professeur Hammer (Genbank, Gatersleben, Allemagne).

Les graines de *Datura innoxia* Mill. ont été semées sous deux conditions : stérile sur milieu gélosé (semis en culture *in vitro*) et non stérile [sur laine de roche ou dans un mélange de sable/terreau (1/1)].

II-1.2 Matériel bactérien et vecteurs utilisés

II-1.2.1 Souches bactériennes

Différentes souches d'*Agrobacterium rhizogenes* (ATCC : American Type Culture Collection) sont utilisées : TR7, TR107, 11325 et 15834. Ces souches commercialisées par le centre de collection bactérienne (BCCMTM/LMG Bacteria Collection) de l'Université de Gent (Belgique).

II-1.2.2 Vecteurs de transformation

Les plasmides binaires portant l'ADN-T utilisés sont : pTDE4 et pPE113 (planche 6). Ces plasmides possèdent des gènes, situés en dehors de leur ADN-T, leur conférant des résistances à des antibiotiques. Cela permet une sélection. Les deux plasmides ont été introduits dans les bactéries *A. rhizogenes* TR7 par électroporation.

Le plasmide pTDE4

Ce plasmide a été fourni par l'équipe du Professeur Dirk Inzé (Université de Gent, Belgique). La carte du plasmide est présentée sur la planche 6-A. Il possède des séquences conférant des résistances à la spectinomycine, à la streptomycine et à la carbénicilline. L'ADN-T de ce plasmide contient un gène *nptII* et un gène rapporteur *gus*. Le gène *nptII* codant pour la néomycine phosphotransférase, est utilisé comme marqueur de sélection. Il est sous le contrôle du promoteur 35S, constitutif du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), et du terminateur (3' nos) de la nopaline synthase d'*A. tumefaciens*. Il confère une résistance à

la kanamycine chez les plantes transformées. Le gène rapporteur *gus* code la β -glucuronidase. Cette enzyme permet d'obtenir une coloration bleue des plantes transformées lors de la dégradation de son substrat, le X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide). La séquence *gus* est sous le contrôle du promoteur de la nopaline synthase (Pnos), et son terminateur (3'oc) est celui de l'octopine synthase d'*A. tumefaciens*.

Le plasmide pPE113

Le plasmide pPE113 contient une séquence codante d'une protéine *Green Fluorescent Protein* (GFP) modifiée. Ce vecteur nous a été fourni par le Professeur François Guérineau, Equipe BIoPI de l'Université Picardie Jules Verne.

Ce plasmide porte une séquence codante de résistance à la kanamycine à l'extérieur des bordures droite et gauche. A l'intérieur de ces bordures d'insertion se trouvent le gène *nptII*, dont le promoteur et le terminateur sont ceux de la nopaline synthase (Pnos et 3'nos), et le gène rapporteur *eGFP* codant la protéine EGFP (GFPmut1 ; Cormack *et al.*, 1996). Le gène *eGFP* est sous le contrôle d'un double promoteur fort 35S et d'une séquence terminatrice du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV polyA) (planche 6-B). Les cellules exprimant la protéine EGFP deviennent fluorescentes quand elles sont exposées à la lumière UV. La protéine EGFP possède deux substitutions dans la séquence protéique (Phe-64 en Leu et Ser-65 en Thr) par rapport à la protéine sauvage, ce qui augmente sa fluorescence de 4 à 35 fois supérieure à celle de la GFP sauvage (Li *et al.*, 1998).

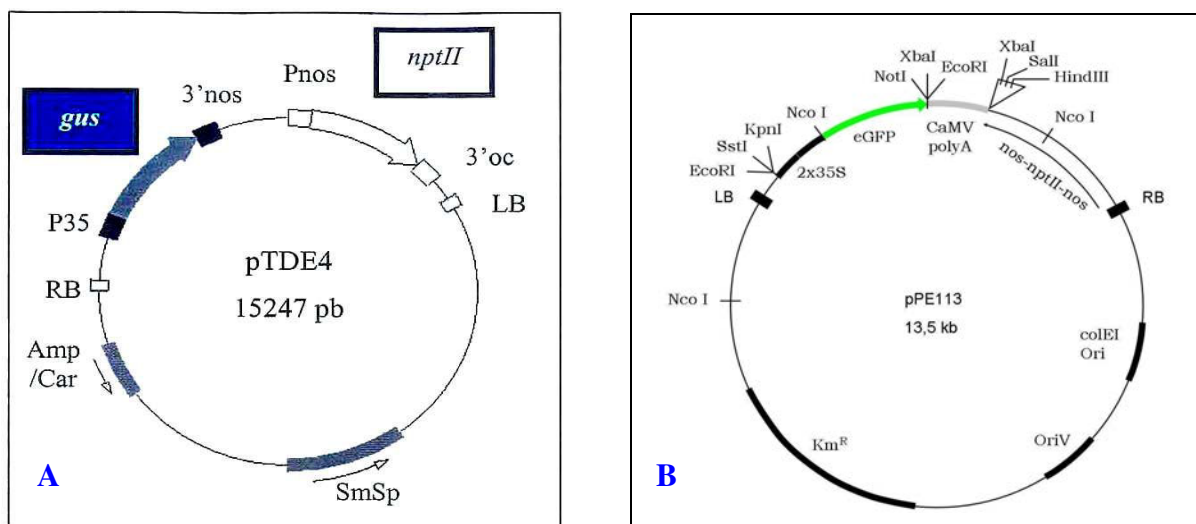


Planche 6 : Schéma des plasmides pTDE4 (A) et pPE113 (B).

Légende :

- *RL et LB*, bords droit et gauche de l'ADN-T (*Left Border/Right Border*)
- *P35S*, promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
- *Pnos* et *3'nos*, promoteur et terminateur de la nopaline synthase d'*A. tumefaciens*
- *3'oc*, terminateur de l'octopine synthase d'*A. tumefaciens*
- *gus (UidA)*, gène codant la β -glucuronidase
- *eGFP*, gène codant la protéine verte fluorescente d'*Aequorea victoria*
- *nptII*, gène codant la néomycine phospho-transféraseII conférant la résistance à la kanamycine.

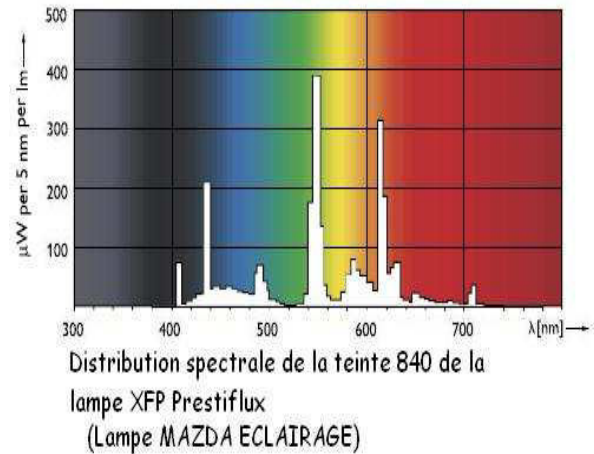
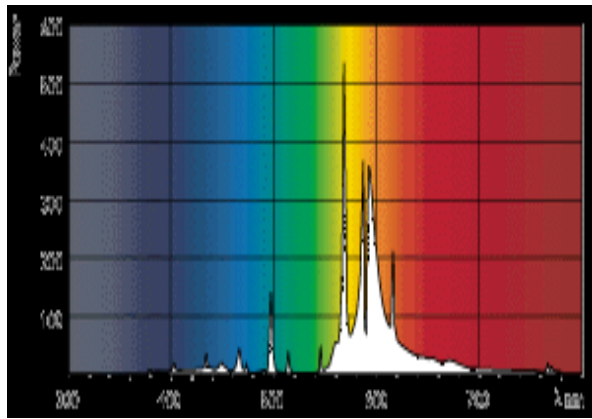
Gènes de résistance uniquement sous contrôle de promoteurs bactériens : **Amp/Carb**, résistance à l'ampicilline et à la carbénicilline ; **SmSp** : résistance à la Streptomycine et à la Spectinomycine.

II-1.3 Conditions de culture

En fonction des conditions matérielles et de la disponibilité des équipements de laboratoire, les plantes ont été cultivées soit en phytotron, soit dans une chambre de culture, soit en serre.

II-1.3.1 Culture en phytotron

Les conditions climatiques dans le phytotron sont stables et parfaitement maîtrisées. Une photopériode de 16h à 25°C et une scotopériode de 8h à 20°C. L'humidité relative est de 60-70%. L'intensité d'éclairage est de 180 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (unité de Rayonnement Photosynthétique Actif) en utilisant de la lumière blanche (lampes à vapeur de mercure : BTC 250 Riviera ou lampe Mazda éclairage, planche 7b) ou de la lumière orange (lampes à vapeur de sodium : Philips Son-T Agro 400) (planche 7a). Toutes les cultures stériles sont placées en phytotron ou en chambre de culture.



a : Lampe à vapeur de sodium.

b : Lampe à vapeur de mercure.

Planche 7 : Le spectre électromagnétique de la lumière orange (a) et de la lumière blanche (b); les radiations visibles ou lumière, représentent une partie du spectre électromagnétique total.

II-1.3.2 Culture en serre

Les expériences non stériles sont placées dans la serre où les conditions de culture sont beaucoup plus variables. La température de l'air est contrôlée par un automate. Celui-ci déclenche l'aérotherme lorsque la température descend en dessous de 15°C (en hiver) et aère la serre au dessus de 25°C par un système de « cooling » (en été). Dans certaines expérimentations, l'éclairage artificiel est assuré par des lampes (soit de mercure, soit de sodium), pendant 12 ou 16 heures, en complément de la lumière naturelle.

II-2 Milieux de culture

II-2.1 Milieux de base pour bactéries

Le milieu gélosé YMB (Yeast Mannitol Broth) (Subba Rao, 1977) est utilisé pour la croissance des souches d'*A. rhizogenes* (annexe 1).

Le milieu gélosé TSA (Tryptic Soy Agar) (AER 2005-TF001B-20/12/04) (annexe 2), est utilisé pour cultiver les microorganismes présents dans le milieu nutritif.

II-2.2 Milieux de culture basique pour les plantes de daturas

Nous avons utilisé un milieu MS (Murashige et Skoog, 1962 ; sans sucre, ni vitamines) comme la solution nutritive pour la culture de daturas (annexe 3). A partir de ce milieu, nous avons réalisé un milieu gélosé pour faire des germinations afin d'avoir les plantules stériles.

Tout au long de nos travaux, le milieu MS est pris comme référence, mais nous avons aussi utilisé le milieu Adatom dans une autre expérimentation (annexe 4).

II-2.3 Milieu de régénération des racines de daturas

L'étape *in vitro*, pour cultiver des racines issues des expériences d'inoculation avec des bactéries, est réalisée sur milieu MS/2 additionné de 30g de saccharose et de 300mg de céfotaxime. On ajuste le pH à 5,8, puis on ajoute de l'agar (8 g/L) avant autoclavage (barème de stérilisation : 120°C pendant 20 min.). Après refroidissement, le milieu se solidifie.

Nous avons aussi utilisé le milieu liquide B5 dérivés (Gamborg *et al.*, 1968) pour cultiver des racines issues de co-cultures hydroponiques de datura (annexe 5).

II-2.4 Composés ajoutés en fonction des différentes expériences

Selon les besoins des différentes expériences, un composé phénolique et/ou antibiotique est ajouté au milieu de culture. L'acétosyringone (As) et les antibiotiques sont ajoutés après autoclavage, lorsque la température est inférieure à 65°C, pour éviter leur dégradation.

L'As, un composé phénolique, est connu pour stimuler la virulence des bactéries en vue de la transformation génétique. Il a été ajouté, pour certaines expériences, au milieu de culture des bactéries et des plantes à une concentration de 50µM.

Les antibiotiques utilisés dans nos travaux, la kanamycine, l'ampicilline à 50mg/L sont ajoutées au milieu de culture bactérienne. Ils servent à la sélection. La kanamycine est ajoutée au milieu de culture pour sélectionner les bactéries d'*A. rhizogenes* TR7-*egfp*. L'ampicilline est utilisée pour sélectionner les bactéries d'*A. rhizogenes* TR7-*gus* (tableau 5).

Tableau 5 : Récapitulatif des souches bactériennes utilisées, de leurs milieux de culture et de leurs antibiotiques de sélection.

Souches bactériennes	Milieux de culture	Antibiotiques/Concentration finale (en mg/L)
<i>A. rhizogenes</i> TR7 sauvage	YMB	Sans antibiotique
<i>A. rhizogenes</i> TR7- <i>gfp</i>	YMB	Kanamycine/50
<i>A. rhizogenes</i> TR7- <i>gus</i>	YMB	Ampicilline/50

Une dose de céfotaxime à 300mg/L, ajoutée au milieu de régénération, a été utilisée afin d'éliminer les bactéries tout en préservant au mieux les capacités de multiplication racinaire.

Il s'agit d'approcher la concentration minimale inhibitrice de la croissance de la souche d'*A. rhizogenes* (Déchaux-Duval, 2005).

II-3 Méthodes de culture

II-3.1 Culture de bactéries

II-3.1.1 Culture sur milieu solide

Les différentes souches d'*A. rhizogenes* sauvages sont entretenues en boîtes de Petri, sur un milieu YMB sans antibiotique. Pour leur entretien, ces souches bactériennes sont repiquées tous les mois sur un milieu neuf. Les boîtes de Petri sont d'abord placées dans une étuve à 28°C pendant 3 jours, puis elles sont conservées au réfrigérateur à 4°C pour des utilisations ultérieures.

II-3.1.2 Culture en milieu liquide

Avant chaque expérience, les bactéries ont été repiquées puis laissées pendant 2-3 jours à l'étuve à 28°C sur milieu solide. Cette étape est répétée trois fois pour avoir une croissance optimale. A partir d'une colonie isolée, les bactéries sont ensuite cultivées en milieu liquide YMB stérile, afin d'obtenir une seule souche pure et d'assurer la reprise de la croissance bactérienne. Des études préalables de cinétique (Buchon, 1996 ; Lièvre, 2004) nous ont permises d'estimer la croissance des souches bactériennes. La phase exponentielle croissance des souches se situe entre 20 à 24 heures, à 28°C, sous agitation orbitale (120 rpm). Le temps de culture est déterminé par la densité bactérienne du milieu liquide. Cette densité est mesurée à une longueur d'onde de 600 nm (de 1 à 1,5). Pour les souches bactériennes transformées, nous additionnons un antibiotique, correspondant aux résistances portées par les plasmides (marqueur de sélection), à 50 mg/L.

Avant d'inoculer les plantes, le milieu est enlevé par centrifugation pendant trois minutes à 400 rpm. Le culot est repris avec du milieu MS stérile et ajouté directement dans la solution nutritive.

II-3.2 Germination des graines de *D. innoxia* en conditions stériles

Les graines sont traitées par de l'acide sulfurique concentré à 96% (temps de contact : 5 minutes), afin de perméabiliser les enveloppes tégumentaires et éliminer certains

contaminants présents à leur surface. Elles sont ensuite rincées à l'eau. Une décontamination approfondie est obtenue par immersion, pendant 25-30 minutes, dans de l'hypochlorite de calcium (CaCl_2O_2) à 7% (p/v), sous agitation (120 rpm). Les graines sont ensuite rincées plusieurs fois à l'eau distillée stérile pour éliminer l'hypochlorite de calcium. Les graines sont trempées dans de l'eau distillée pendant 3 h. Enfin, elles sont déposées sur le milieu de germination avec une densité de 6 à 8 graines par pot (10x5cm de diamètre). Les pots sont ensuite placés dans une chambre de culture *in vitro*. La température est de 22°C, l'humidité relative est de 60%, l'intensité lumineuse est de 160 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sous une photopériode de 16h. Il faut compter de 8 à 10 semaines pour obtenir des plantules suffisamment grandes (stade à quatre feuilles) avant leur transplantation en hydroponie (planche 7b).



Planche 7 b: Germination de graines de *Datura innoxia* sur milieu gélosé depuis un mois.

II-3.3 Germination des graines de *Datura innoxia* en condition non stérile

II-3.3.1 Germination sur laine de roche

Les plaques de laine de roche utilisées (40x25x4cm ; référence GRODAN AOS 36/40) contiennent 200 cubes prédécoupés en carrés de 2cm de côté facilement sécables. Chaque cube est percé d'un trou central dans lequel les graines sont insérées à raison d'une, deux, trois ou quatre graines par trou. Après ensemencement, les plaques sont ensuite déposées dans un bac en PVC dans lequel une hauteur d'eau est maintenue, entre 1 et 2cm. Ces préparations sont réalisées en phytotron et en serre (planche 8a).

II-3.3.2 Germination sur sol

Les plantules utilisées dans les expérimentations non-stériles proviennent essentiellement des semis effectués en serre dans un mélange sable/terreau (1/1) pour favoriser le développement des racines et faciliter le dépotage lors de la mise en culture hydroponique. Les graines sont couvertes par une couche de 0,5cm de sol dans lequel l'humidité est maintenue par un arrosage quotidien. Quatre ou cinq semaines après germination, les plantes ont atteint le stade de 4-6 feuilles vraies. A ce stade de développement, elles peuvent supporter une transplantation en hydroponie (planche 8a).

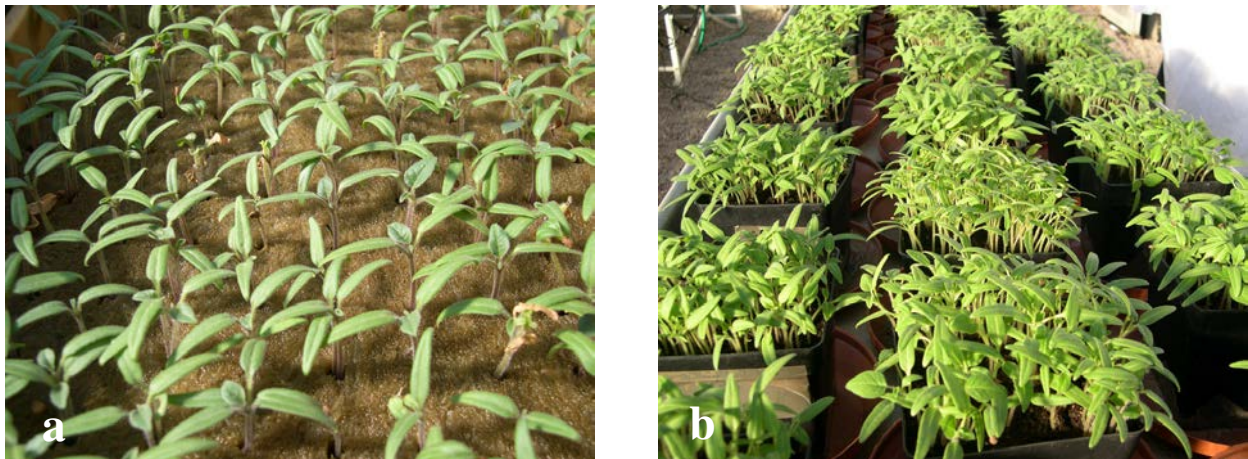


Planche 8 : Germination de graines de *Datura innoxia* sur les cubes de laine de roche (a) et sur du mélange sable/terreau (b) depuis 3 semaines.

II-3.4 Culture hydroponique en condition stérile

II-3.4.1 Dispositif expérimental et conditions de culture

Le dispositif de culture comprend une bouteille en verre (diamètre extérieur : 8,5cm ; hauteur : 25cm) remplie avec un litre de solution nutritive MS (planche 9). Le bouchon de la bouteille est percé de 3 trous : le plus grand, qui se trouve au milieu, permet une transplantation de la plante ; le deuxième est prévu pour le passage d'un tuyau en silicone relié à un filtre 0,2µm permettant l'oxygénation du milieu des racines et le dernier orifice, le plus petit, permet l'aération de la bouteille.

Les plantules axéniques de 5 à 6 cm de hauteur et de 3 à 4 feuilles sont transplantées dans les bouteilles remplies de milieu nutritif en conditions stériles, sous une hotte à flux laminaire. La solution nutritive et l'ensemble du dispositif (tuyaux, filtres-à-air, sacs pour couvrir les plantes) ont été préalablement autoclavés à 120°C pendant environ 20min. Chaque bouteille comprend une plantule. Une fois la plantule mise en place, l'extrémité supérieure de

la bouteille est couverte avec un sac transparent en polypropylène (Sunbag, Sigma) de dimensions 44 x 20,5cm. Le volume de ce sac va permettre le développement des parties aériennes (tige et feuilles) en conditions stériles durant 5 à 6 semaines. Le sac possède un filtre carré de 24mm de côté, de porosité 0,2mm qui autorise les échanges gazeux et sert d'évent.

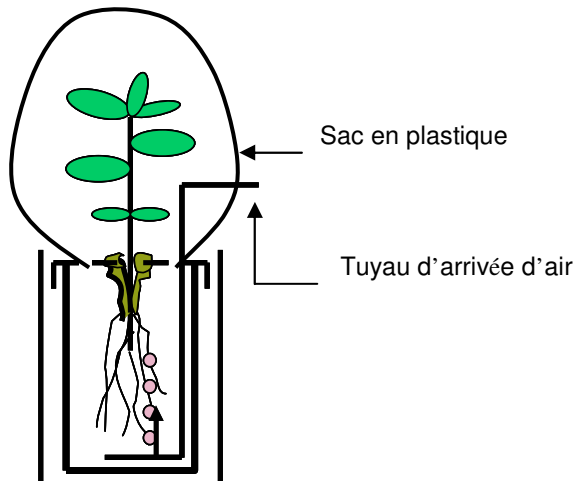


Planche 9 : Dispositif développé dans cette thèse pour la réalisation de culture hydroponique stérile (à gauche) et une culture individuelle de datura depuis 4 semaines (à droite).

L'ensemble de ce dispositif est placé dans un phytotron à la température de 25°C le jour et de 20°C la nuit, avec une humidité relative de 65-70% et un éclairciment de 180 μ mol de photons.m⁻².s⁻¹ pendant 16 heures/jour. Les cultures sont aérées par une source d'air comprimé passant par un filtre de 0,2 μ m pour être stérilisé avant de rentrer dans la bouteille. Enfin, les racines ainsi que le milieu sont maintenus à l'obscurité pour éviter le développement d'algues et favoriser le développement de racines. Un prélèvement quotidien de la température dans le sac qui contient la partie aérienne et de la température du milieu nutritif sont effectués au cours de la culture.

Le même dispositif est utilisé pour ce que nous appellerons par la suite (chapitre II) « plantes témoins non-stériles ». Pour celles-ci, 10mL de solution nutritive issue de culture de daturas se trouvant dans la serre sont ajoutés afin d'avoir une microflore complexe pour les cultures non-stériles.

Le protocole mis en œuvre pour l'obtention de cultures stériles est délicat et parfois, des plantes sont contaminées accidentellement. Ces plantes seront appelées « plantes contaminées ».

II-3.4.2 Test de contamination de plantes

Au moment de la récolte, nous testons tout d'abord les racines des plantes cultivées en hydroponie stérile pour voir si elles n'ont pas été contaminées. Pour se faire, les apex racinaires sont déposés sur milieu TSA solide et incubés pendant 48, 72h et 96h dans une étuve à 28°C. Au sortir de l'étuve, les racines sont observées à la loupe binoculaire pour vérifier l'état de la plante (planche 10).

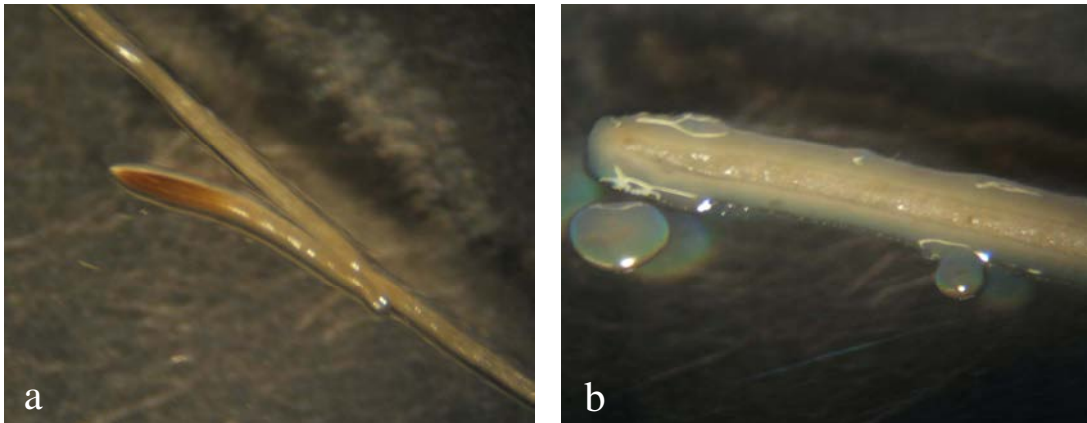


Planche 10 : Racines issues de plantes stériles (a) et de plantes non stériles (b) observées à la loupe binoculaire après 3 jours d'inoculation.

Pour les cultures stériles inoculées avec *A. rhizogenes*, nous testons la contamination de la solution nutritive sur milieu gélosé TSA. Une observation de la forme et de la couleur des colonies bactériennes poussant à la surface du milieu est ensuite réalisée pour vérifier que seul *Agrobacterium* s'est développé (planche 11).

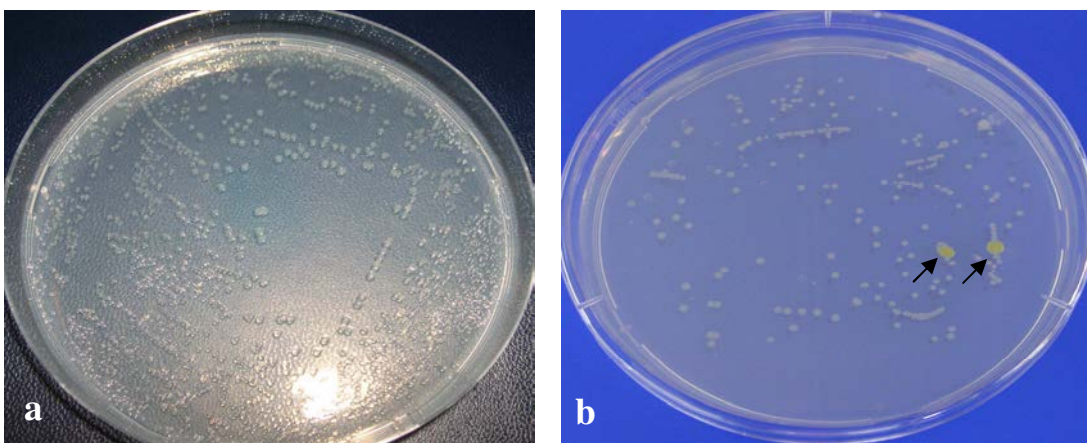


Planche 11 : Contrôle microbiologique par étalement de solutions nutritives sur milieu gélosé TSA en boîte de Pétri. La visualisation et le dénombrement des colonies est effectué après 72h d'incubation à 28°C. Ce test permet de vérifier soit, (a) la présence unique d'*A. rhizogenes* inoculé au cours de culture, soit (b), la présence d'*A. rhizogenes* et celle de microorganismes issus d'une contamination fortuite (flèches).

II-3.5 Culture hydroponique en condition non stérile

La culture hydroponique que nous avons utilisée est une technologie de production caractérisée par une alimentation minérale des racines dans une solution nutritive et ne nécessite pas de support solide. Pour ces travaux, nous avons réalisé des cultures hydroponiques non stériles soit en bac de PVC, soit en systèmes pilotes. Les plantules sont préalablement dépotées. Les racines sont ensuite rincées pour éliminer les particules de sol au moyen d'un jet d'eau à pression modérée puis les plantes sont transférées en hydroponie.

II-3.5.1 Culture en bac PVC

Ce dispositif peut recevoir de 15 à 18 plantes (densité : 100 plantes/m²). Il est constitué d'une plaque de polystyrène extrudé, percée, qui flotte soit sur un bac (56x36x17cm) contenant 20-25L d'eau ou de milieu, soit sur un bac (56x36x23cm) contenant 35-40L (planche 12-a). Les racines des jeunes plantes (4 à 6 semaines) sont débarrassées de la terre et insérées dans les trous d'une plaque de polystyrène où elles sont fixées à l'aide de la laine de roche. L'aération de la solution nutritive est continue afin d'enrichir régulièrement le milieu en oxygène par des capillaires placés au fond du bac. Enfin, les racines ainsi que le milieu sont maintenus à l'obscurité pour éviter le développement d'algues.

II-3.5.2 Culture en système pilote

Système en immersion permanente

Ce système de culture en hydroponie (0,6x5m) est placé sous serre (planche 12-b). Ce dispositif est un développement du système hydroponique à « grande échelle ». Chaque bac métallique (0,6x5m soit 3m²) contient 200L de solution nutritive, sur laquelle flottent 8 plaques de polystyrène extrudé percées (62x56x2,5cm). La solution nutritive est non circulante. Son aération, nécessaire à la respiration des racines, est maintenue de manière continue par un réseau de tuyaux microporeux placés au fond du bac. Les plantes de *Datura* sont déposées sur de l'eau pendant trois jours. Ensuite, la solution nutritive MS est ajoutée. Cette technique est appliquée en vue d'éviter un « choc » pour les plantules en transplantation du sol en milieu hydroponique.



Planche 12 : Culture hydroponique en bac PVC (a) et en système pilote (b).

Système en immersion temporaire (table à marée)

Les dimensions du dispositif sont les mêmes que pour le système pilote en immersion permanente (planche 12-b et 13). Il est alimenté par une cuve de 200L de solution nutritive. Cette technique, également sans substrat, utilise le principe de la circulation d'un film de solution nutritive à l'aide d'une pompe. Grâce à ce système, le milieu nutritif s'enrichit en oxygène dissous au cours de son déplacement, par échange avec l'air. A l'aide d'un programmeur relié à la pompe, les racines sont immergées pendant 15 minutes. Ensuite, les racines restent en émergence pendant 15 minutes, puis le cycle recommence. Ce qui permet aux racines de se réoxygéner après chaque cycle d'arrosage (voir système racinaire cultivé dans une pilote d'immersion temporaire, planche 14).

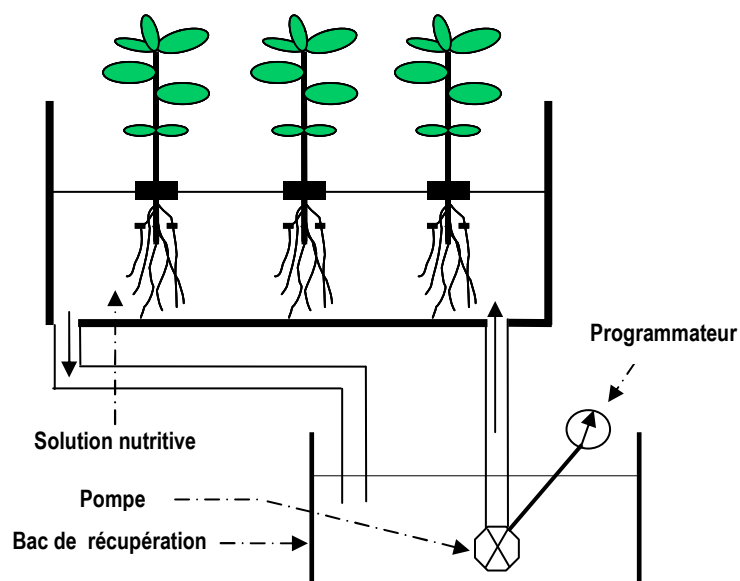


Planche 13 : Schéma du dispositif d'hydroponie en immersion temporaire.



Planche 14 : Racines de *Datura innoxia* en culture hydroponique dans le système pilote.

II-4 Méthodes analytiques

II-4.1 Morphologie racinaire et aérienne

La morphologie racinaire est analysée à l'aide du logiciel WinRHIZO[®] (version : 2002b et 2002c; Régent, Canada) après avoir étalée les racines dans un plateau contenant de l'eau. Les paramètres d'analyse de l'image sont ceux préconisés par Bouma *et al.*, (2000), à savoir une résolution de l'image de 400 dpi et un seuil de détection défini automatiquement par le logiciel. Le seuil de détection correspond à une valeur de niveau de gris au-delà de laquelle un pixel est considéré comme représentant un fragment de racines. Le système WinRHIZO[®] permet théoriquement de détecter les apex, de les dénombrer et d'évaluer aussi la longueur racinaire totale et le diamètre des racines présentes dans la fenêtre d'analyse. A partir de ces mesures, il calcule alors la surface racinaire réelle de l'échantillon.

De la même façon pour la morphologie aérienne, le nombre de feuilles et la surface foliaire sont calculés à l'aide du logiciel WinFOLIA[®] version 2002a. Après avoir scanné les feuilles, les images ont une résolution de 200 dpi.

II-4.2 Echantillonnages de biomasses

Une fois par semaine, un prélèvement est effectué pour la plupart des expériences non stériles. Nous avons réalisé une récolte de trois plantes prises au hasard pour chaque modalité. Les plantes prélevées sont disséquées afin de séparer partie aérienne et partie racinaire. Après avoir pesé la matière fraîche, celle-ci est immédiatement stockée dans un congélateur à -18°C,

dans l'attente d'une lyophilisation (en 48 h), ou séchée dans une étuve (en 72 h à 70-80°C). Après ce traitement, la matière sèche est pesée. Les échantillons sont finalement, finement broyés à l'aide d'un broyeur à billes.

II-4.3 Dénombrement des microorganismes

Afin d'évaluer l'importance de la microflore qui se développe naturellement dans le milieu nutritif au cours du développement des plantes, les microorganismes sont isolés sur milieu TSA gélosé. Une fois par semaine, 1mL de solution nutritive est prélevé en trois endroits différents de chaque bac. Sur les 3mL récupéré, on fait trois prélèvements de 100µL. Ensuite, on dilue chaque prélèvement de 10^{-1} à 10^{-6} . Enfin, on prélève 100µL sur chaque prélèvement dilué et on les étale sur milieu TSA. L'ensemencement est placé dans une étuve pendant 48 heures à 28°C. Le dénombrement des colonies, à l'aide d'un compteur de bactéries (Colony Counter, Scienceware USA), s'effectue après 24h et 48h d'incubation en vue de quantifier le nombre de colonies (UFC/mL) présentes dans la solution nutritive.

II-4.4 Mesure de la dégradation de H&S dans les solutions nutritives

Cette expérience permet de déterminer si les microorganismes sont responsables d'une dégradation d'hyoscyamine et de scopolamine au cours de la culture. Chaque semaine, trois prélèvements de 7mL de la solution nutritive sont effectués. Pour chacun, on ajoute 1mL d'une solution d'hyoscyamine ou de scopolamine ou des deux à 100mg/L. Les mélanges sont ensuite mis en incubation à 25°C et placés au phytotron ou dans un incubateur, sous agitation à 100rpm. Des prélèvements de 1mL sont réalisés à des temps différents : 0, 5, 7, 24, 48 et 72h. Chaque prélèvement est ensuite stocké immédiatement au congélateur, à -20°C, en vue d'une analyse en CPG et/ou en CLHP. Cette technique d'incubation permet de suivre la vitesse de dégradation des alcaloïdes par les éléments présents dans le milieu nutritif et de connaître leur temps demi-vie.

II-4.5 Méthode d'extraction

II-4.5.1 Extraction des alcaloïdes de la biomasse sèche des plantes

Pour une analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG)

A la matière sèche broyée (100 mg), on ajoute 200 µL d'homatropine (250mg/L dans HCl 0,1N ; étalon interne) et 4,8mL d'HCl 0,1N. Le mélange est passé au Vortex trois fois 30 secondes. La solution est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 4000rpm. Le surnageant est repassé au Vortex, pendant 5 minutes, avec 4mL de chloroforme et amené à un pH supérieur ou égal à 9 par ajout de NH₄OH (28%). Ce mélange est alors centrifugé encore une fois à 4000rpm. La phase chloroformique est récupérée à la pipette Pasteur. Dans certains cas, cette phase est injectée directement en CPG. Dans d'autres cas, afin de concentrer les alcaloïdes, le chloroforme est évaporé sous balayage d'azote, puis le résidu est repris dans 1 mL de chloroforme (annexe 6).

Pour une analyse chromatographique liquide haute performance (CLHP)

La poudre sèche finement broyée (30 mg) est pesée dans un tube Eppendorf de 2 mL auquel on ajoute un volume 1,5 mL de solvant d'extraction (80% d'acide chlorhydrique 0,1N et 20% d'éthanol 90%). Ce mélange est agité fortement au Vortex trois fois 1 minute puis centrifugé à 14000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est injecté directement en CLHP après filtration (0,2µm). La mise au point des conditions d'extraction est présentée en annexe 7.

II-4.5.2 Extraction des alcaloïdes de la solution nutritive pour CPG

A un volume de 750µL de milieu nutritif prélevé à un temps donné sont ajoutés 750µL d'une solution chloroformique à 10mg/L d'homatropine (étalon interne) et 20µL de NH₄OH (28%) pour ajuster le pH de la solution à 9. Ce mélange est agité fortement au Vortex pendant 30-40 secondes pour bien mélanger les deux phases et faire passer les alcaloïdes de la phase aqueuse à la phase chloroformique. Cette solution est ensuite centrifugée à 1200rpm pendant 10 minutes. Enfin, la phase chloroformique contenant les alcaloïdes est prélevée pour une injection en CPG.

II-4.6 Méthode de dosage des alcaloïdes tropaniques

Les analyses biochimiques réalisées dans ce travail concernent les métabolites secondaires produits par la plante entière en distinguant parties aériennes et racinaires. Il s'agit des alcaloïdes tropaniques, l'hyoscyamine et la scopolamine. Ces molécules sont détectées et dosées de deux façons, soit par CPG soit par CLHP, en fonction de l'équipement disponible.

II-4.6.1 Par CPG (Tran, 2005)

La séparation et la quantification des alcaloïdes, hyoscyamine et scopolamine, ont été obtenues par chromatographie en phase gazeuse (CP 9003 Chrompack) (planche 15). Cette chaîne est constituée d'un passeur d'échantillons (CP-9010 Automatic Liquide Sampler) et d'un détecteur à ionisation à flamme (FID Model901A). L'injection est faite en mode splitless 1 μ L (injection 1 μ L qui passe entièrement sur la colonne). Température de l'injecteur: 300°C, programme de température: de 130 à 300°C à 10°C par minute, température du détecteur FID: 280°C. Ces différents éléments sont pilotés par un ordinateur équipé du logiciel Maestro[®]. Grâce à ce dernier, s'affichent en fonction du temps, des pics correspondants à chaque molécule vaporisée et détectée.

La colonne (Varian ; WCOT FUSED SILICA 10mx0.25mm ID ; COATING CP-SIL 5CB ; DF=0.12) est couplée à une précolonne (2.5mx0.53mm Fused silica ; retention Gap avec un diamètre de 0.53/0.25). Les molécules hydrocarbonées injectées sont séparées dans la colonne avec un courant gazeux d'hélium (He₂ 50kPa). Les molécules sont ionisées grâce à la flamme du détecteur FID obtenue par combustion de l'hydrogène et de l'air (O₂). Deux électrodes fournissent la différence de potentiel (200V) nécessaire à l'analyse des molécules.

Pour la détermination de l'hyoscyamine et de la scopolamine dans les échantillons, on se base sur le temps de rétention. Dans ce but, on injecte une solution contenant de l'hyoscyamine et de la scopolamine standard (100mg/l). Ensuite, si l'échantillon présente un pic correspondant au temps de rétention des standards, on peut calculer la quantité d'hyoscyamine et de scopolamine dans l'échantillon qui est lui-même injecté à un volume de 1 μ L d'étalon externe et interne (homatropine). Le calcul final tient compte des H&S.

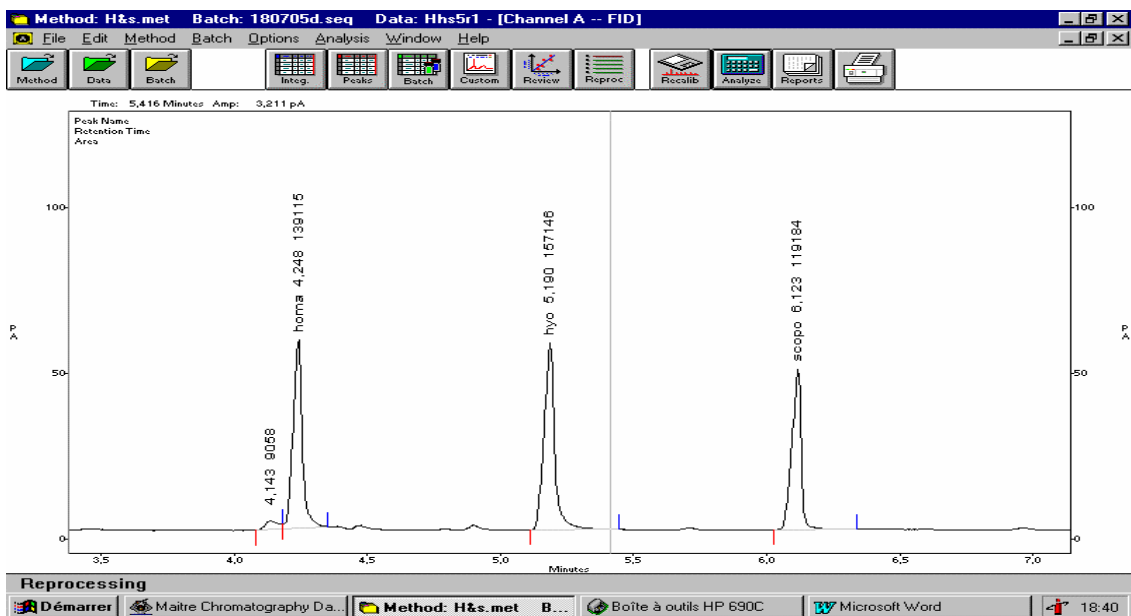


Planche 15 : Spectre CPG de la solution standard contenant de l'homatropine, de l'hyoscyamine et de la scopolamine à 100mg/L.

II-4.6.2 Par CLHP (Al Balkhi, 2004 ; Déchaux-Duval, 2005)

Les alcaloïdes tropaniques contenus dans les plantes ont été analysés en routine au laboratoire « Androgenèse et Biotechnologie ».

La chaîne CLHP est constituée des éléments suivants :

- ✓ Une pompe haute pression TSP P100 (ThermoElectron, Les Ulis, France),
- ✓ Un passeur d'échantillons TSP AS100 (ThermoElectron, Les Ulis, France),
- ✓ Une colonne apolaire YMC ODS-AQ (AIT, le mesnil Le Roi, France) : \varnothing 5 μ m, 120Å, 250 mm x 4,6mm,
- ✓ Un détecteur UV WAT 484 (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France),
- ✓ Un logiciel d'analyse de signaux HPLC AZUR[®] V3.0 (Datalys, Saint Martin d'Herès, France).

Cette technique est basée sur les différences d'affinité des molécules à analyser avec la phase mobile (l'éluant) et la phase solide (la colonne de type phase inverse). Dans notre cas, la polarité des molécules va influencer leur rétention dans la colonne fortement apolaire, constituée de silice greffée de chaîne à 18 carbones, et entraînés par un éluant fortement polaire. La détection se fait en UV à 204nm, les liaisons C=O présentant un chromophore avec un maximum d'absorbance à cette longueur d'onde.

L'analyse des échantillons par CLHP est réalisée comme suit :

- ✓ Débit de la pompe : 0,8 mL/minute
- ✓ Eluant : 860 mL d'eau, 140 mL d'acétonitrile, 0,5 mL d'acide formique
- ✓ Colonne : Apolaire C18
- ✓ Volume d'échantillon : 20 μ L
- ✓ Temps d'analyse : 40 minutes
- ✓ Détection : 204 nm,

Des standards de scopolamine, d'hyoscyamine et d'homatropine sont utilisés pour quantifier les molécules présentes dans les échantillons (planche 16). La courbe d'étalonnage étant linéaire entre 0 et 10 mg/L, les standards sont préparés à une concentration constante de 10mg/L. Les molécules en solution se répartissent selon leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire et se trouvent donc éluées les unes après les autres.

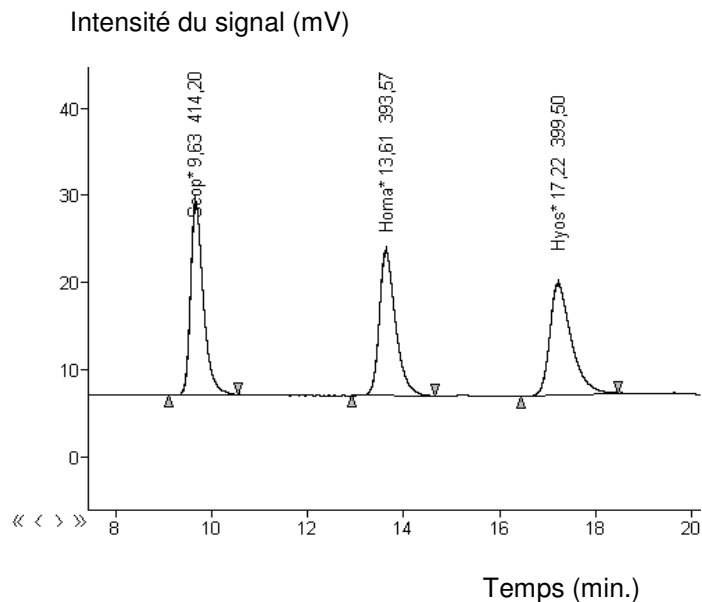


Planche 16 : Spectre CLHP de la solution standard contenant de la scopolamine, de l'homatropine et de l'hyoscyamine à 10mg/L

II-4.7 Méthode de dosage de l'azote total et du carbone total

La détermination de la teneur totale en azote et en carbone des échantillons végétaux secs broyés est réalisée à l'aide d'un analyseur élémentaire (NC Analyser Flashea 1112 series, Thermo Electron Corporation, Italie). La mesure est basée sur la méthode de Dumas qui dose l'azote et le carbone contenus dans l'échantillon après une combustion complète et détection des gaz élémentaires.

Avant d'initier le dosage, l'appareil est étalonné à l'aide de deux standards l'acide aspartique et la nicotinamide dont le pourcentage de carbone et d'azote est connu.

Pour chaque échantillon, la pesée (entre 3 et 7mg) se fait à l'aide d'une balance de précision à 0,01mg, puis est conditionné dans une nacelle en étain (P/N 252 08000, Thermo).

La nacelle est comprimée puis introduite dans l'analyseur par un chargeur automatique. Le gaz vecteur de l'analyse est l'hélium (140mL/min). L'échantillon subit une combustion « flash » en présence d'oxygène dans un four à oxydation maintenu à 920°C. L'oxydation est complétée par catalyse et les halogènes sont piégés dans un tube contenant de l'oxyde de chrome et de l'oxyde cobalto-cobaltique argenté. Les gaz sont ensuite réduits sur un tube de cuivre maintenu à 600°C où l'oxygène et les sulfates sont piégés. A cette température, les oxydes d'azote sont réduits en azote moléculaire (N₂) et les oxydes de carbone en CO₂. L'eau est enfin piégée sur un filtre d'anhydron (perchlorate de magnésium). Le CO₂ et l'N₂ présents dans le tampon de gaz sont alors séparés sur une colonne de chromatographie en phase gazeuse, en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire (polymère poreux à base de divinylbenzène). Ils sont détectés en sortie de colonne par un catharomètre. Les signaux, enregistrés sous forme de chromatogrammes, sont analysés par le logiciel Flash EA 1112 (Thermo Electron Corporation, Italie) qui identifie les molécules (CO₂ et N₂) par leur temps de rétention et détermine leur quantité par rapport aux étalons cités précédemment.

II-4.8 Méthode de dosage des chlorophylles

La teneur en chlorophylles des cellules des feuilles est exprimée en µg/g de matière fraîche (MF) (Viña *et al.*, 2007). Pour ce faire, on prélève trois feuilles les plus proches du premier bouton floral, puis on les broie dans un mortier contenant de l'azote liquide. On pèse 0,2g de MF pour le dosage des chlorophylles. Les chlorophylles a et b sont extraites par 4 mL

d'acétone 80% (v/v), à l'obscurité et à 4°C pendant une nuit. Les débris cellulaires et les protéines qui ont précipité sont éliminés par centrifugation pendant 10 minutes à 8000g. Les surnageants sont dilués (D : facteur de dilution) par de l'acétone 80% avant d'être analysés au spectrophotomètre. Les absorbances 645nm (A_{645}) et 663nm (A_{663}) sont retenues pour le calcul de la teneur en chlorophylles (Marckinney, 1941 ; Chory *et al.*, 1991):

$$\text{Chlorophylle (a)} = [12,7 * (A_{663}) - 2,69 * (A_{645})] * D * V / m$$

$$\text{Chlorophylle (b)} = [22,9 * (A_{645}) - 4,48 * (A_{663})] * D * V / m$$

$$\text{Teneur en chlorophylles} = \text{chlorophylle (a)} + \text{chlorophylle (b)}$$

II-5 Technique de transformation bactérienne par électroporation

II-5.1 Préparation des bactéries compétentes

Un volume de 5mL de milieu YMB estensemencé par une colonie bactérienne. Les bactéries (*A. rhizogenes* TR7) sont cultivées sous agitation pendant une nuit (14-16h) à 28°C. Ensuite, la culture est diluée 10 fois dans du milieu YMB frais (volume final de 50mL) et incubée jusqu'à atteindre une densité optique ($\lambda=600\text{nm}$) de 0,8. La culture est refroidie dans la glace puis sédimentée par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 1600rpm. Toutes les étapes ultérieures se font à 4°C. Le culot est lavé par 50mL d'eau ultra pure stérile, centrifugé 15 min. à 1600rpm. Ce lavage est répété 3 fois, puis les cellules (culot) sont reprises dans 10mL de glycérol 10%. Des aliquotes de 50 μ l de la suspension sont stockés à -80°C.

II-5.2 Transformation bactérienne

La transformation est effectuée dans une cuve d'électroporation (électrodes espacées de 0,2cm). L'ADN plasmidique (2 à 100ng) est mélangé à 50 μ l de suspension bactérienne et laissé sur glace environ 1 minute. La cuve est placée dans l'électroporateur (Cell Electroporation System ; Cell Ject) réglé sur une capacité de 40 μ F et une résistance 192 Ω . Une impulsion électrique de 2,5kV/cm est appliquée avant d'ajouter 1mL de milieu YMB froid. Après 3h d'incubation à 28°C, les bactéries sont étalées sur un milieu sélectionné gélosé additionné de kanamycine pour la construction avec pPE113 (*egfp*), ou d'ampicilline pour la construction avec pTDE4 (*gus*), à 50mg/L. Après 3 nuits à 28°C, les colonies isolées sont repiquées dans 3mL de YMB/antibiotique.

II-5.3 Extraction et analyse d'ADN plasmidique

II-5.3.1 Préparation de plasmide : minipreps

Au cours de ce travail, la technique d'extraction d'ADN plasmidique est utilisée selon le protocole fourni avec le kit « QIAprep® Spin Miniprep Kit » (QIAGEN).

On culotte par centrifugation pendant 2 minutes à 13000 rpm, 1,5mL d'une culture bactérienne qui s'est multipliée pendant 20-24h pour *A. rhizogenes* et 14-16h pour *Escherichia coli*. Lors de la première utilisation, il faut être sûr d'ajouter le volume approprié de solution de RNase A à la solution de resuspension (tampon P1). Le culot de bactéries est resuspendu complètement avec 250µL de solution de resuspension en vortexant ou en pipetant.

Les cellules resuspendues sont lysées par ajout de 250µL de solution de lyse (tampon P2). Le contenu est immédiatement inversé (6 à 8 fois) jusqu'à ce que la mixture devienne claire et visqueuse. Il ne faut pas passer au vortex. Un mélange brutal pourrait causer des cassures de l'ADN génomique, qui provoquerait alors une contamination de l'ADN plasmidique par de l'ADN génomique. La réaction de lyse ne doit pas excéder 5 minutes. Une lyse alcaline prolongée pourrait, de manière permanente, dénaturer la super hélice de l'ADN plasmidique, ce qui la rendrait inutilisable pour beaucoup d'autres applications en aval.

Les débris cellulaires sont précipités en additionnant 350µL de solution de neutralisation/fixation (tampon N3). Les tubes sont mélangés par inversion, 4 à 6 fois. Les débris cellulaires sont culottés par centrifugation de plus de 13000rpm pendant 10 minutes. Si le surnageant contient une grande quantité de particules en suspension après centrifugation, recentrifuger avant de continuer.

Une *GenElute™ Miniprep Binding Column* (QIAGEN) est insérée dans un tube à centrifuger. On additionne 500µL de solution de préparation (tampon BP) pour conditionner la colonne et on centrifuge à 13000rpm pendant 1 minute. Le liquide est enlevé. Le lysat éclairci est transféré dans la colonne conditionnée précédemment. On centrifuge à plus de 13000rpm pendant 1 minute. On ajoute 750µL de solution de lavage à la colonne. On centrifuge à plus de 13000rpm pendant une minute. L'étape de nettoyage de la colonne permet d'enlever les sels résiduels et les autres contaminants introduits précédemment. Le liquide est enlevé et on centrifuge à nouveau à vitesse maximale pendant 2 minutes pour enlever l'excès d'éthanol contenu dans la solution de lavage.

La colonne est transférée dans un nouveau tube auquel on additionne 50 μ L d'eau ultrapure ou de solution Tris-HCl 5mM, pH8,0. On centrifuge à plus de 13000rpm pendant une minute. L'ADN est maintenant présent dans l'éluât, et il est prêt pour une utilisation immédiate ou il peut être stocké à -20°C.

II-5.3.2 Digestion par des enzymes de restriction

Une digestion type contient, pour 20 μ L :

0,2 μ L BSA (10 mg/mL)

10 μ L de minipreps (de 0,1 à 1 μ g d'ADN) (§ II-5.3.1)

2 μ L de tampon commercial de l'enzyme de restriction 10X

0,5 μ L d'enzyme (EcoRI)

7,3 μ L d'eau ultra pure stérile.

Le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant 2h30 min.

II-6 Evaluation de l'état transgénique du matériel végétal obtenu

II-6.1 Observation de la protéine EGFP

La fluorescence de la protéine EGFP de racines infectées a été observée à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E-800 équipé d'un filtre Nikon B-2A (excitation à 450-490 nm). Les photographies ont été réalisées à l'aide d'un appareil photo numérique.

II-6.2 Test de détection de la β -glucuronidase (test histochimique X-gluc)

L'un des gènes transférés par *A. rhizogenes TR7* qui contient le plasmide pTDE4 est le gène rapporteur *gus* codant pour l'enzyme β -glucuronidase. Selon le substrat utilisé, l'activité de cet enzyme dans les tissus transformés peut être suivie de façon qualitative.

La β -glucuronidase hydrolyse le substrat X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) en un dérivé indoxyl incolore. Ce dernier subit alors une dimérisation oxydative spontanée conduisant à la formation d'un précipité bleu (Jefferson, 1987).

Cette méthode de coloration présente plusieurs avantages : d'une part, l'activité GUS n'est pas endogène à la plupart des plantes et, d'autre part, elle est stable et ne nécessite pas la présence de cofacteurs ni de conditions ioniques précises.

Le matériel végétal à tester est incubé à 37°C, pour 1 mL de tampon (0,1M Tris-HCl, 50µM NaCl, pH7), on additionne 10µL de X-gluc, préparé à 50mg/mL dans du DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Après 24 heures d'incubation, pour enlever la chlorophylle et faciliter l'observation, les racines sont mises pendant 2 heures dans de l'éthanol 70%. L'observation à la loupe binoculaire permet de mettre en évidence la présence de l'enzyme β-glucuronidase par l'apparition d'une coloration bleue. Le test est réalisé sur des organes supposés transformés et des témoins. Deux échantillons témoins sont aussi utilisés à chaque expérience, l'un servant de témoin positif (plante reconnue comme transformée : *Arabidopsis*), l'autre de témoin négatif (*Datura innoxia* sans traitement avec des agrobactéries).

II-6.3 Confirmation moléculaire de la transformation

II-6.3.1 Extraction de l'ADN génomique végétal

Cette technique d'extraction d'ADN génomique est utilisée selon le protocole fourni avec le kit « DNeasy Plant Mini Kit » (QIAGEN). Ces procédures sont utilisées pour extraire les échantillons nécessaires aux PCR de vérification.

Les racines fraîche (environ 500mg) sont broyées finement dans un mortier refroidi dans de l'azote liquide. A la poudre, transférée dans des tubes eppendorfs de 2mL, on ajoute 400µL d'une solution de tampon de lyse (AP1) et 4µL d'une solution de RNase A. Le tout est ensuite passé au vortex avant d'être placé 10 minutes à 65°C dans un bain-marie. Le tube de prélèvement de type Eppendorf est agité deux à trois fois durant l'incubation par retournement.

Au sortir du bain-marie, on ajoute 130µL d'une solution de tampon de précipitation (AP2). Le mélange est agité puis on laisse le tube dans de la glace pendant 5 minutes. Cette étape permettra de précipiter les protéines et les polysaccharides. On transfère ensuite ce mélange dans une colonne QIAshredder Mini Spin (lilac) placée dans un tube de 2mL. On centrifuge pendant 2 minutes à 14000rpm.

Le surnageant est transféré dans un nouveau tube en faisant attention de ne pas pipeter les débris sédimentés au fond du tube. On ajoute une solution de tampon de liaison (AP3/E) à raison de 1,5 fois le volume du filtrat récupéré.

Un volume de 650 μL du mélange précédant est mis dans une colonne DNeasy Mini Spin placée dans un tube de 2mL. On centrifuge pendant une minute à 8000rpm. On jette le filtrat et on recommence la même opération avec le reste du mélange.

Ensuite, la colonne est placée dans un nouveau tube et on ajoute 500 μL d'une solution de tampon de lavage (AW) et on centrifuge pendant 2 minutes à 14000rpm.

On transfère la colonne DNeasy Mini Spin dans un tube de 1,5 à 2mL et on ajoute 100 μL d'une solution de tampon d'éluion (AE) directement sur la membrane DNeasy. Le tube est incubé pendant 5 minutes à température ambiante (15-25°C), ensuite une centrifugation pendant 1 minute à 8000rpm. Cette fraction contient l'ADN génomique en quantité et en qualité. On le transfère ensuite dans un tube à vis de 1,5mL et on le conserve à -20°C.

II-6.3.2 Détection de la présence des transgènes par PCR

L'analyse de l'ADN génomique par PCR a pour but de confirmer la présence du transgène au sein de cellules végétales.

L'enzyme utilisée est une ADN polymérase thermostable (*Taq* DNA polymérase car issue de la bactérie *Thermophilus aquaticus*).

Il y a trois étapes principales, répétées une trentaines de fois :

- ✚ La dénaturation (à 95°C) ;
- ✚ L'hybridation : la température d'hybridation est fonction de la séquence des amorces. Il est préférable que les amorces aient des températures de fusion (TM) proches. Dans ce cas là, la température d'hybridation correspond à la plus faible des températures de fusion. Si les TM sont éloignées, on rallonge l'amorce la plus courte. Les amorces s'apparient sur les régions complémentaires de l'ADN. La polymérase vient alors se fixer sur cet ADN double brin ;
- ✚ L'élongation pour la synthèse du brin complémentaire (à 72°C, température optimale pour le fonctionnement de la *Taq*).

L'amplification est réalisée à partir de deux amorces qui s'hybrident sur chaque brin complémentaire du transgène et délimitent le fragment d'ADN à amplifier dont la taille varie en fonction des amorces utilisées.

II-6.3.3 Electrophorèse d'ADN (bactérien et/ou végétal) sur gel d'agarose

Les gels de 1 à 1,5% d'agarose sont préparés à partir d'un tampon de migration TAE 1X (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM).

Les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur poids moléculaire, sur gel d'agarose préparé. Avant le dépôt, les échantillons d'ADN (20µL) sont additionnés de 3 µL de tampon de charge (Tris 50mM pH 7,5 ; EDTA 100 mM pH 7,5 ; 10% glycérol ; 0,05% Bleu de Bromophénol). Lors de la migration, le gel d'agarose baignant dans du tampon TAE 1X, est soumis à une tension de 100V pendant 45-60 min. Le gel est ensuite trempé 10 min. dans un bain de BET (Bromure d'Ethidium à 10 mg/mL), puis, les gels sont révélés sous la lumière UV 245 nm par un appareil d'analyse (Gel Doc 2000[®], Biorad).

Pour chaque électrophorèse, un marqueur (3 µL) contenant une gamme de fragments d'ADN de longueur connue (1kb Smartladder, Eurogentec) est déposé dans l'un des puits du gel, afin d'évaluer la taille des fragments obtenus par PCR.

II-7 Traitement statistique des données

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statboxpro, en utilisant soit i) la procédure d'analyse de variance à un facteur, avec éventuellement comparaison des moyennes selon le test de Newman-Keuls au seuil $\alpha = 5\%$, soit ii) les calculs de régression linéaire ou non linéaire. Les discriminations de groupes homogènes par rapport à l'effet d'un facteur ont été également réalisées avec un test de Newman-Keuls (seuil de 5%).

Partie III

Résultats et Interprétations

Positionnement de la problématique scientifique

Envisager de produire des métabolites secondaires de plantes à partir de cultures hors sols est une possibilité extrêmement intéressante. Le développement industriel d'un tel procédé exige de pouvoir être en mesure de contrôler tous les paramètres essentiels du dispositif de production.

Ainsi, le système "Plantes à Traire" inclut différents étages.

Tout d'abord, il s'agit de mettre en culture le matériel le plus pertinent pour la bio-production d'une molécule ou d'un ensemble de molécules intéressant le marché. Le choix du (ou des) couple(s) plante-métabolite(s) est donc capital. Il est basé sur un travail de veille stratégique incluant analyse de la bibliographie scientifique, technique (dont les bases brevets), économique ainsi que sur tous les éléments d'information susceptibles d'être obtenus lors d'échange avec des spécialistes de l'industrie ou de la recherche.

Le choix d'un couple plante-métabolite(s) est capital. Il peut éventuellement se faire en deux temps. Soit en choisissant un métabolite ou un groupe de métabolites et en testant les meilleures plantes candidates, soit en choisissant une plante déjà testée répondant bien en culture hors-sol et en déterminant sa capacité de production d'un point de vue qualitatif [quelle(s) molécule(s)?] et quantitatif [combien?].

Sur la base d'essais préliminaires, une fois le choix opéré du couple plante-métabolite(s), il va s'agir de mettre en oeuvre l'espèce choisie et d'adapter (optimiser) le procédé de production.

Durant la première période de ma Thèse, à la suite des travaux de Tran (2005), j'ai commencé par me familiariser avec la technique de culture hors sol. Ensuite, j'ai étudié l'effet de l'environnement biotique et abiotique sur la croissance, le développement et l'accumulation des alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* Mill., notre plante modèle, cultivée en hydroponie. Le but est de déterminer et hiérarchiser les paramètres permettant l'obtention d'une biomasse de qualité (*i.e.* haute quantité de biomasse produite et contenu élevé en alcaloïdes dans la plante, et notamment dans ses racines).

Le premier chapitre rassemble les résultats majeurs que nous avons obtenus sur l'étude de la production des alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* par les effets de l'environnement abiotique.

CHAPITRE I

Effets de l'environnement abiotique sur la croissance et la production de métabolites secondaires

Comme nous l'avons évoqué précédemment, ce travail de thèse a pour but de décrire et de comprendre l'impact de facteurs de l'environnement sur la croissance, le développement et la synthèse d'alcaloïdes chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hydroponiques. Cette étude est conduite dans un contexte industriel plus large qui a pour objet de produire des composés d'intérêt.

En terme de facteurs de l'environnement biotique et abiotique des plantes, nous avons du limiter nos travaux selon des critères techniques (faisabilité dans le temps) et des critères pratiques (transposabilité potentielle à l'échelle industrielle). Notre approche a volontairement distingué deux parties:

- ✚ l'une relative aux paramètres physiques de l'environnement de la plante,
- ✚ l'autre relative aux paramètres chimiques de l'environnement de la plante.

Effets de "l'environnement physique" sur la croissance et la production de métabolites secondaires

Au champ, la plante ne peut que subir les conditions climatiques. Les possibilités d'intervention humaine sont relativement faibles. Par contre, en serre, et en conditions hors sol, il est possible de jouer sur les paramètres majeurs de l'environnement des plantes. Parmi les facteurs physiques de cet environnement, la température, la lumière et l'aération de la solution nutritive (*i.e.* oxygénation) sont facilement modulables. Nous nous sommes donc demandés ici quelle pouvait être leur influence sur la croissance et la synthèse d'alcaloïdes chez *Datura innoxia* Mill. Dans notre démarche, nous sommes partis des "contraintes de terrain" (capacité technique de l'industriel à faire varier les paramètres à coût raisonnable) pour mettre en place nos objectifs de recherche.

III-1. Mise en place d'un dispositif pilote de culture et essai d'amélioration de la disponibilité en oxygène pour la respiration racinaire.

Par ailleurs, après avoir été longtemps des techniques de travail utilisées par les physiologistes pour déterminer les besoins des plantes en eau et en éléments minéraux, les cultures hydroponiques sont maintenant passées dans le domaine de l'agriculture au sens

large. Une des difficultés rencontrée dans la mise en œuvre de ces techniques concerne l'aération des racines des plantes cultivées (Lesaint *et al.*, 1983).

Nous nous sommes donc demandés : "**de quelle manière est-il possible de jouer sur la respiration racinaire de daturas hydroponiques cultivés à relativement grande échelle ?**". Ainsi, il a d'abord été nécessaire d'acquérir le savoir faire sur la culture de cette plante en condition hors sol à l'échelle pilote. A partir de là, nous avons pu envisager un travail sur la modulation du régime d'aération des racines. Les paragraphes suivants présentent un jeu de résultats portant sur la comparaison de deux systèmes de culture :

- ❖ un système classique de référence dit en « immersion permanente » (aquiculture, Tran 2005),
- ❖ un nouveau système dit en « immersion temporaire » (table à marée, Vu, 2006).

Ces dispositifs sont décrits dans la partie « matériels et méthodes ». Le choix du système 1 (pilote d'aquiculture; immersion permanente) s'imposait comme référence incontournable par rapport aux travaux antérieurs (Tran, 2005). Le choix du système 2 (pilote table à marées; immersion temporaire) s'est fait sur la base de travaux de Lee *et al.* (1998) ; Gontier *et al.* (2004), qui montraient que ce régime de culture permettait une amélioration globale des conditions de culture via une meilleure oxygénation des tissus végétaux. D'autres possibilités d'augmenter la disponibilité de l'oxygène ont été envisagées (travail sur le régime de bullage d'air, bullage d'O₂ pur, aéroponie...) mais, à ce stade nous avons décidé de comparer immersion permanente et temporaire. C'est ce que nous allons présenter maintenant.

III-1.1 Croissance végétative

Dès sept jours de culture, les paramètres de croissance des plantes, ont été étudiés à partir de prélèvements destructifs, effectués une fois par semaine. A chaque récolte, et pour chaque modalité, "immersion permanente" (témoin) et "immersion temporaire" (traitement), nous avons prélevé trois individus, considérés comme des répétitions biologiques d'une même modalité. L'analyse de croissance, en fonction du temps, a été complétée par des pesées des plaques de plantes (radeaux), à raison de deux fois par semaine pendant 7 semaines (paragraphe suivant).

Les résultats obtenus (figures 1a-1b, 2a-2b) illustrent les paramètres de croissance, comme la hauteur des plantes, le diamètre des tiges et l'évolution du nombre total des feuilles

dans les deux systèmes, varient en fonction du temps. Dès la troisième semaine, le dispositif en immersion temporaire permet d'obtenir des plantes présentant une hauteur moyenne supérieure à celle des plantes issues du dispositif de référence (immersion permanente). En parallèle, les tiges sont plus grosses (augmentation du diamètre moyen) et les plantes présentent un nombre de feuille plus élevé en immersion temporaire. En ce qui concerne la longueur maximale des racines, même si les plantes en immersion temporaire semblent être avantagées, la différence n'est pas statistiquement significative à toutes les dates de prélèvement. De plus, pour des raisons d'ordre mécanique, l'allongement apparent des racines se trouve limité par la profondeur du bassin de culture. Le régime d'immersion temporaire implique (à marée basse) une phase au cours de laquelle les plantes sont posées sur leurs racines au fond du bassin.

En conséquence, le facteur longueur apparente des racines ne semble pas être un indicateur très pertinent de la croissance des plantes.

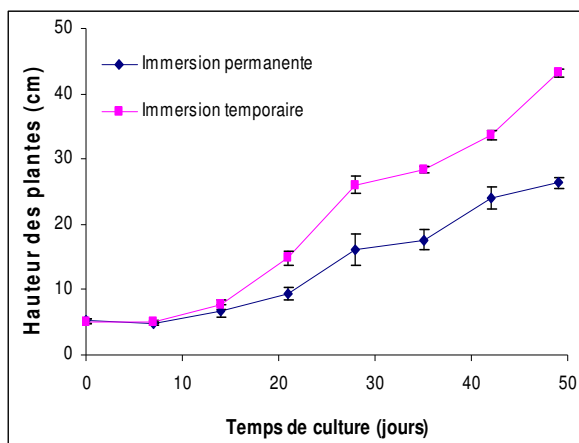


Figure 1a : Evolution de la hauteur des plantes cultivées en immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

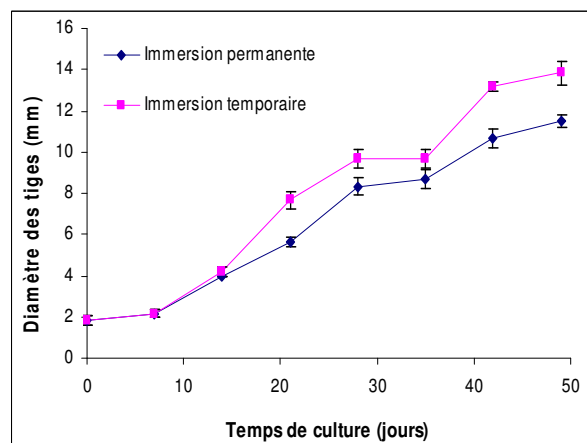


Figure 1b : Evolution du diamètre des tiges de daturas cultivés en immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

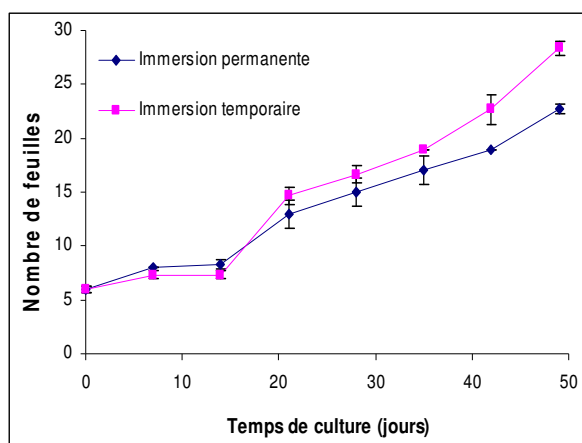


Figure 2a : Evolution du nombre de feuilles de plantes cultivées en immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

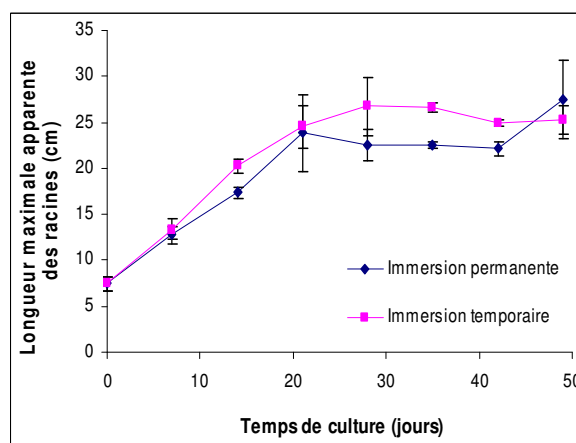


Figure 2b: Evolution de la longueur maximale apparente des racines de plantes cultivées en immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

III-1.2 Production de biomasse

La biomasse des plantes augmente au cours du temps. Au bout deux semaines de culture, celle des plantes en « immersion temporaire » est supérieure à celle des plantes témoins (en « immersion permanente »).

Après 7 semaines, lorsque les plantes arrivent au stade floraison-fructification, la masse fraîche obtenue est de 2,9 et 5,5 kg/m², pour les cultures en « immersion permanente » et « immersion temporaire », respectivement (figure). Ces valeurs correspondent à une matière sèche de 3,6 et 5 g/plante, (figure) et 360 et 500 g/m² respectivement. En terme de biomasse, le passage du système standard au système en immersion temporaire a donc permis une augmentation de la productivité (+40% de matière sèche).

L'immersion temporaire favorise la croissance de biomasse des plantes par rapport à celle de plante à l'immersion permanente (figure 3). Ainsi, le rapport entre biomasse des parties racinaires et aériennes s'en trouve amélioré (figure 4).

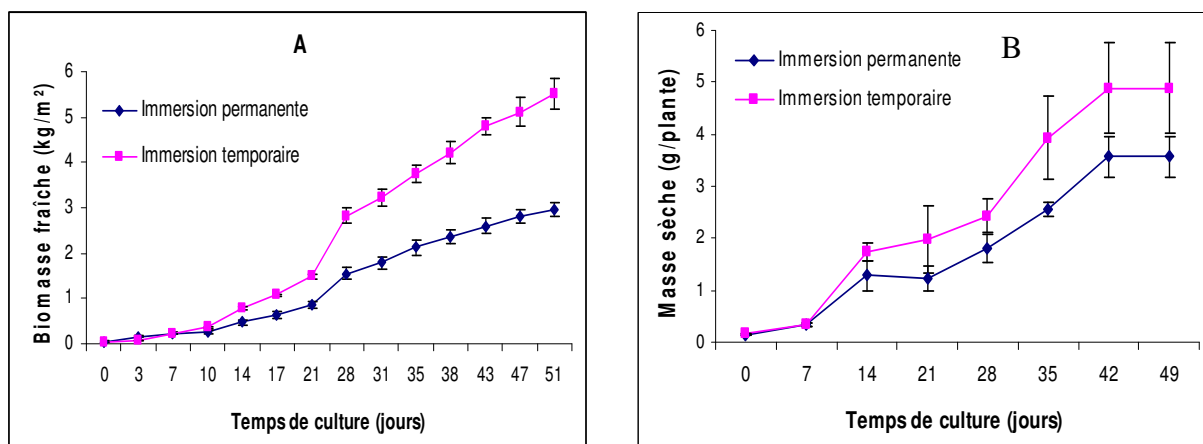


Figure 3: Evolution de la biomasse de plantes (A : matière fraîche, B : matière sèche) au cours du temps. La mesure a été réalisée par pesées répétées de 3 radeaux de culture contenant 18 plantes. Les valeurs présentées ici sont divisées par 18 et indiquent donc (après retrait de la tare) la masse fraîche moyenne des plantes.

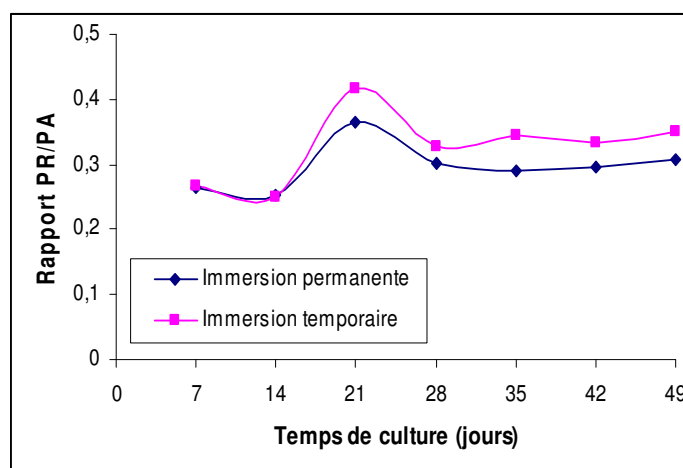


Figure 4: Evolution du rapport entre la masse sèche des parties racinaires (PR) et la biomasse des parties aériennes (PA) au cours de la culture des plantes en immersion permanente ou temporaire.

III-1.3 Production de métabolites secondaires

Après 49 jours de culture, les teneurs en hyoscyamine sont de 0,02 et 0,13%MS (figure 5a) respectivement, dans les parties aériennes de plantes en « immersion permanente » et en « immersion temporaire ». Elle est de 0,05%MS dans les parties racinaires, en « immersion permanente », et de 0,11%MS en « immersion temporaire » (figure 5b). La teneur en hyoscyamine dans les tiges feuillées et dans les racines est donc améliorée de 6 fois.

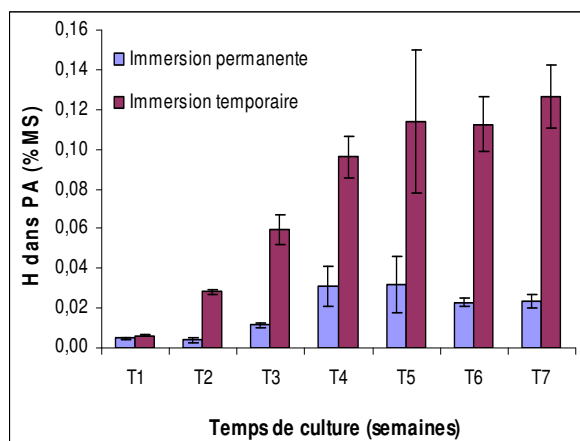


Figure 5a : Teneur en hyoscyamine (H) dans les parties aériennes (PA) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

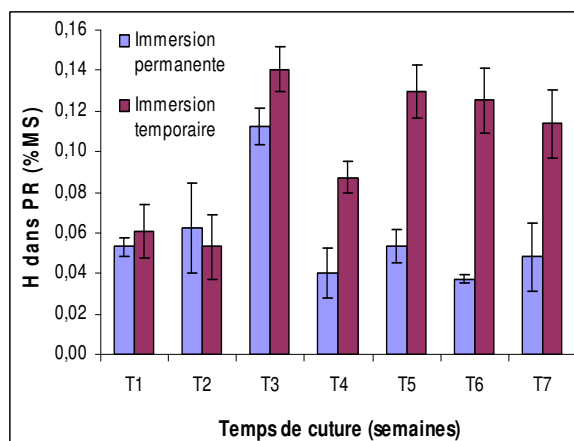


Figure 5b: Teneur en hyoscyamine (H) dans les parties racinaires (PR) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

Pour la scopolamine, ses teneurs sont de 0,14 et 0,30%MS, dans les parties aériennes (figure 6a) des plantes, respectivement, en « immersion permanente » et « immersion temporaire ». La modification du dispositif de culture a donc permis une augmentation de la teneur en scopolamine d'un facteur 2, dans les parties aériennes. Ce résultat ne se retrouve toutefois pas au niveau des racines où les teneurs en scopolamine sont identiques pour toutes les plantes (figure 6b).

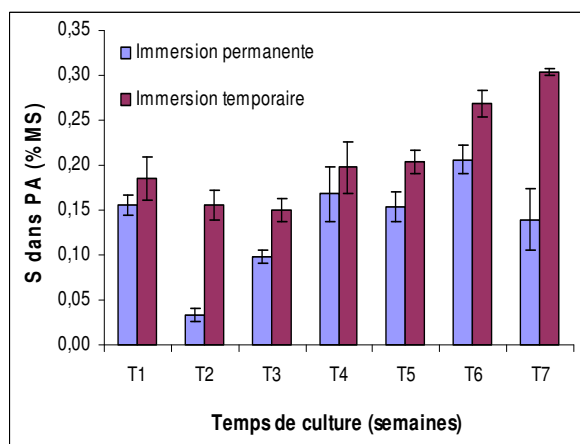


Figure 6a: Teneur en scopolamine (S) dans les parties aériennes (PA) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

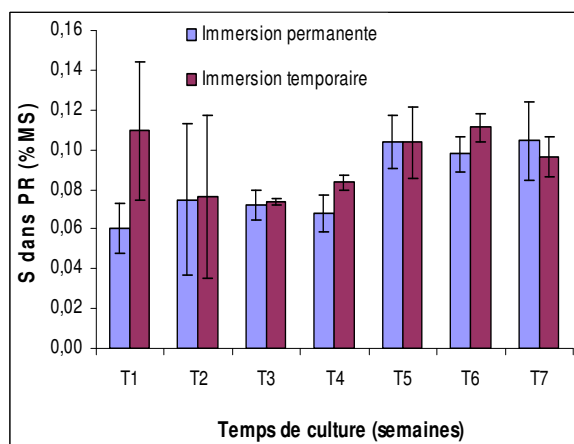


Figure 6b : Teneur en scopolamine (S) dans les parties racinaires (PR) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

A la dernière date de récolte (49^{ème} jour), la teneur totale en alcaloïdes tropaniques (H&S), est de 0,16%MS, dans les plantes en « immersion permanente », et 0,38%MS dans les plantes en « immersion temporaire » (figure 7a). La teneur en H&S a donc été améliorée de plus de 2,4 fois en ayant recours à l'immersion temporaire. La quantité totale de H&S est de 6 mg/plante chez les « témoins », contre 18 mg chez plantes « traitées » (figure 7b). Avec une

densité de plantation de 100 plantes/m², nous avons donc produit 0,57g de H&S/m² en culture « témoin » et 1,84g de H&S/m² en culture « traitée »; soit 3,23 fois plus sur le même pas de temps.

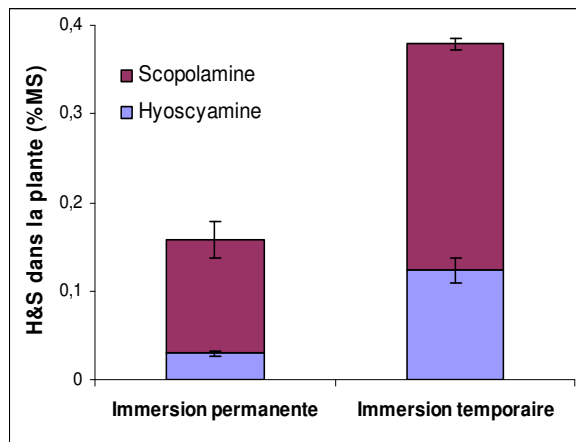


Figure 7a : Teneur en H&S dans les plantes entières au bout de 7 semaines de culture en immersion temporaire et en immersion permanente.

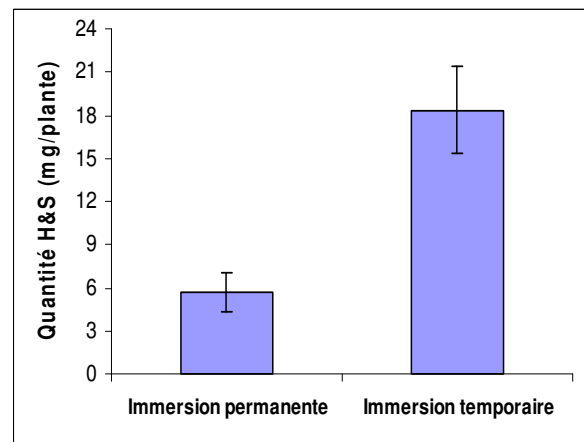


Figure 7b: Quantité totale d'alkaloïdes dans les plantes entières au bout de 7 semaines de culture en immersion temporaire et en immersion permanente.

III-1.4 Discussion et conclusion partielle

Le fonctionnement du système racinaire nécessite de l'énergie libérée au cours du processus respiratoire en présence d'oxygène. Les cellules des racines ont donc besoin en permanence d'oxygène ; ce dernier est absorbé, sous forme dissoute, dans l'eau de la solution nutritive. Il faut donc en permanence que les racines trouvent suffisamment d'oxygène à leur surface pour fonctionner dans de bonnes conditions.

Les besoins en oxygène et la vitesse de respiration du système racinaire varient en fonction de différents facteurs : l'espèce végétale, le stade de développement, la température du milieu de culture, l'intensité d'éclairage des parties aériennes, la quantité de racines et la concentration en dioxyde de carbone dans le milieu (Richter, 1988 ; Lee *et al.*, 1998 ; Shiao et Doran, 2000).

La concentration en oxygène dissout peut diminuer au moment où les racines en ont le plus besoin : cela perturberait alors le fonctionnement du système racinaire, provoquant un vieillissement (sénescence) prématuré des plants, conduisant ainsi à une baisse du rendement.

Cette première expérimentation nous a permis de déterminer l'impact d'un changement du système de culture en remplaçant l'immersion permanente avec bullage d'air à débit constant (0,1vvm environ) par un régime d'immersion temporaire censé améliorer la disponibilité en oxygène pour les racines. *In vitro*, chez *Atropa belladonna*, Lee *et al.* (1998)

ont montré qu'avec une aération à 1 vvm (air), la biomasse de leurs racines est augmentée 6 fois et la proportion de scopolamine dans les racines passe de 5,7 à 11,9% au bout de 4 semaines de culture comparativement aux racines témoins cultivées en Erlenmeyer. Dans notre cas, la croissance des plantes et l'accumulation de H&S ont aussi été modifiées et les résultats ainsi obtenus sont très encourageants :

- Ils soulignent la forte capacité de *Datura innoxia* Mill. à produire rapidement de la biomasse dans un système de culture hydroponique.

- Le dispositif de culture en pilote « immersion temporaire » est décrit comme un moyen simple pour obtenir une bonne oxygénation homogène des racines (Gontier *et al.* 2004). Ici, il améliore notablement la productivité en terme de biomasse et de métabolites secondaires accumulés dans la plante. Ce système favorise assurément un brassage de la solution qui évite la formation probable d'un gradient de concentration d'ions autour des racines. Grâce à ce système, les racines auraient alors plus facilement accès aux nutriments ainsi qu'à l'oxygène.

Nous sommes partis de l'hypothèse que l'immersion temporaire améliorerait l'oxygénation des racines et nous avons en quelque sorte utilisée nos plantes comme test biologique. Cette démarche présente des limites sur le plan explicatif mais elle a le mérite d'être transférable à un cas concret d'application à l'échelle industrielle (*i.e.* pilotes de culture sous forme de tables à marées).

III-2. Effet de l'intensité de la lumière

La lumière apporte l'énergie nécessaire à la photosynthèse et, ainsi, la croissance des plantes varie selon le spectre, l'intensité et la photopériode (Afreen *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2001).

Dans le cadre de notre travail, nous avons cherché à savoir si des intensifications d'éclairage pourraient avoir un effet positif sur les plantes hydroponiques. L'expérimentation a été réalisée en serre, sous éclairage naturel (période hivernale photopériode 8-10h - intensité maximale journalière $325\mu\text{mol de photons/m}^2/\text{s}^1$ - moyenne $228\pm 77\mu\text{mol de photons/m}^2/\text{s}^1$ (annexe 8) renforcé par une lumière artificielle émise par des lampes à vapeur de mercure (éclairage pendant 14h entre de 8h à 22h). Quatre modalités ont été établies en positionnant des lampes identiques à des hauteurs différentes (planche 17, 18) Les valeurs suivantes ont

ainsi été mesurées de nuit: intensité I: 118,67, intensité II: 144,87, intensité III : 151,07 et intensité IV : 189,09 μmol de photons/ m^2/s (annexe 8).

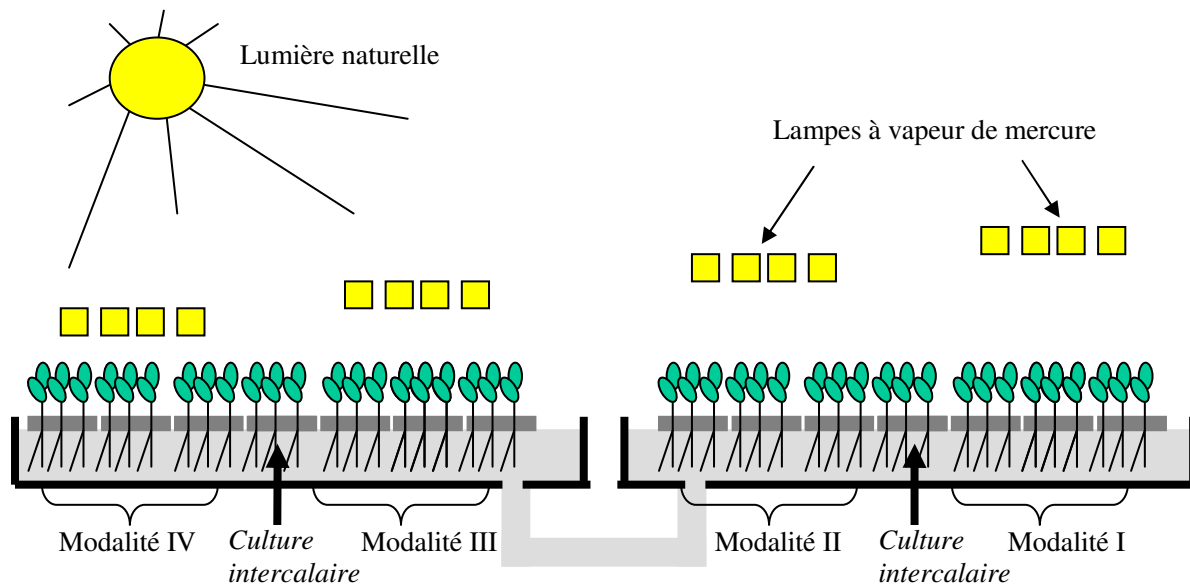


Planche 17: Schéma du dispositif expérimental mis en œuvre pour tester l'effet d'un renforcement de la lumière naturelle par une lumière artificielle à différentes intensités d'éclairage pour une même durée de "sur-illumination" ; (hauteurs des lampes par rapport à la surface de l'eau: modalité I, II, III, et IV; hauteur 120, 100, 70 et 50 cm, respectivement).



Planche 18 : Culture de *Datura innoxia* (2 semaines) en hydroponie sous différentes intensités de lumière.

Les plantes ont été cultivées dans un double système de "culture hydroponique pilote" de 0,2x(0,6x5)m. Chaque modalité correspond à trois plaques (radeaux), et chacune contient 36 plantes. Entre deux modalités, une plaque intercalaire est considérée comme la bordure (non utilisée pour les prélèvements). L'ensemble de la culture a été conduit pendant 22 jours.

Les paramètres de croissance, et la teneur en H&S, ont été mesurés tout au long de l'expérience.

Au démarrage de la culture, les plantes avaient toutes la même biomasse et la même taille. Les paramètres de croissance (matière fraîche, matière sèche, hauteur des plantes, longueur maximale des racines, surface foliaire) ont été étudiés à partir de prélèvements destructifs effectués à 0, 15, 18 et 22 jours après la transplantation. Nous avons également mesuré la biomasse fraîche de 36 plantes (plaque sans prélèvement) au cours du temps.

III-2.1 Croissance des plantes cultivées sous quatre intensités d'éclairage

Au bout de 2 semaines de culture, l'effet intensité de la lumière est observable. Au 22^{ème} jour, les plantes sont au stade moyen "bouton floral" (Tran, 2005), et le groupe I-II et III-IV se distinguent en terme de hauteurs des plantes ($50\pm 4\text{cm}$ et $35\pm 2,5\text{cm}$ respectivement; figure 8a).

L'intensification de la lumière a favorisé le développement des parties aériennes. Par contre, les racines ne semblent pas affectées par l'éclairage appliqué dans cette expérience. Leur longueur maximale moyenne, pour toutes les modalités, est d'environ 28cm (figure 8b).

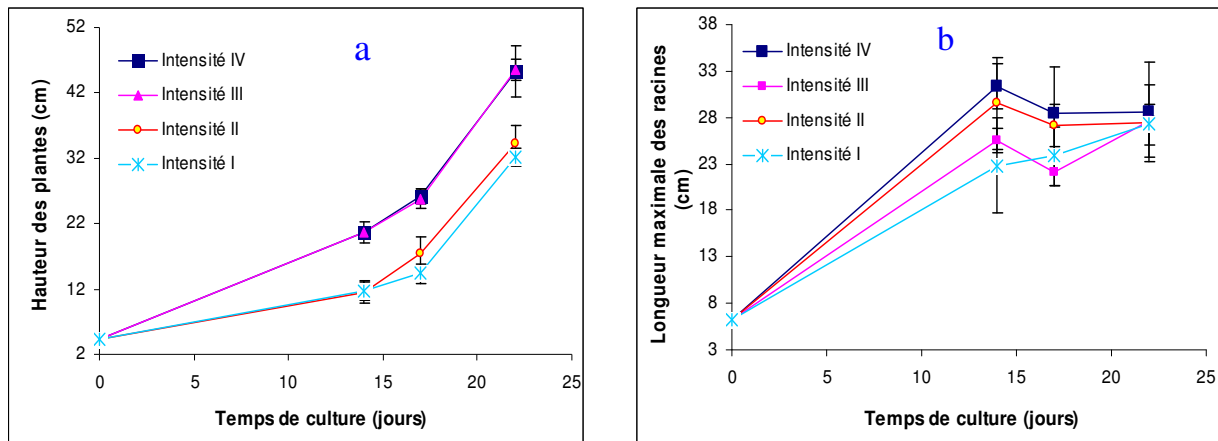


Figure 8 : Evolution de la hauteur des plantes (a) et de la longueur maximale des racines (b) au cours du temps.

La surface foliaire est très affectée par le traitement lumineux. Au 22^{ème} jour de culture, elle atteint des valeurs de $800\text{ cm}^2/\text{plante}$ pour les intensités I, II et III, et $1000\text{ cm}^2/\text{plante}$ pour l'intensité IV (figure 9a). Le nombre moyen de feuilles est de 16 pour les plantes de la modalité IV, contre 13-14 pour les autres (figure 9b). Les plantes exposées à l'intensité lumineuse la plus forte (modalité IV) ont donc une surface foliaire et un nombre de feuilles

plus importants. L'effet du traitement n'est statistiquement significatif que sous l'intensité la plus forte.

Compte tenu des conditions climatiques dans la serre, si seule la très forte sur-illumination des plantes (intensité IV : $189,09 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) donne un résultat statistiquement significatif, on a observé une tendance globale à l'augmentation de la hauteur de tiges, de la surface foliaire et du nombre de feuilles en lien avec l'intensité de la lumière.

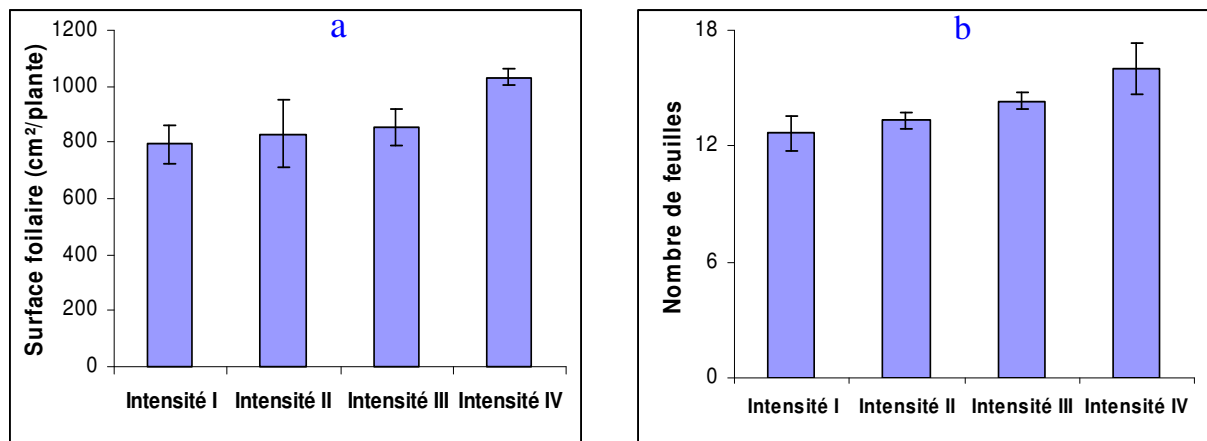


Figure 9 : Surface foliaire (a) et nombre de feuilles (b) de plantes cultivées sous différentes intensités de lumière après 22 jours de culture.

III-2.2 Production de biomasse sous quatre intensités d'éclairage

Nous avons constaté que *Datura innoxia* a réagi à la lumière. Les plantes sont bien développées et croissent très rapidement (cf. paragraphe précédent). Au 22^{ème} jour, les biomasses fraîches moyennes sont de 4500 et 5500 g/m² (figure 10a), sous les intensités I-II et III-IV, respectivement. En terme de matière sèche, nous obtenons des valeurs de 2,82 et 4,84 g/plante, sous les intensités I-II, et 7,51 et 8,32g/plante sous les intensités III-IV (figure 10b), soit des rendements de 282, 484, 751 et 832 g de MS/m² sur 22 jours. La lumière a donc un effet sur le rendement en matière sèche totale, quelle que soit la date considérée. La masse sèche est alors préférentiellement accumulée dans les tiges feuillées représentant de 70 à 80% de la masse totale de la plante.

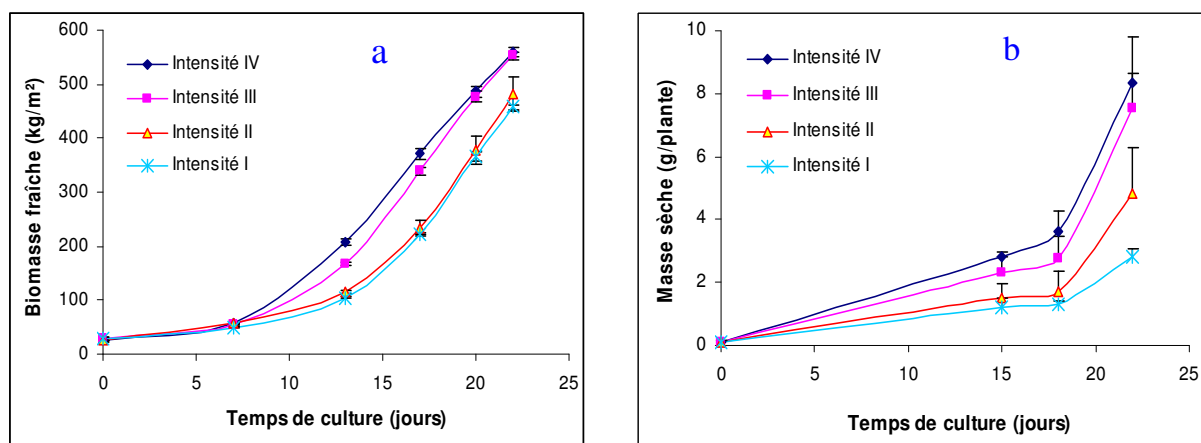


Figure 10 : Evolution de la biomasse fraîche (a) et sèche (b) des plantes au cours du temps.

Le contrôle visuel semblait faire apparaître une légère différence de croissance au bout d'une semaine de culture. En effet, avec les intensités III et IV, la biomasse est plus importante que celle des plantes en intensités I et II ; la différence augmente progressivement au cours du temps. L'effet positif des deux groupes d'éclairage sur la croissance et le développement de *Datura innoxia* apparaît statiquement à partir de 2 semaines de culture, (test de Newman-Keuls, seuil $\alpha=5\%$). Après analyse de la croissance, nous avons déterminé la teneur en H&S dans les mêmes plantes.

III-2.3 Production d'alcaloïdes tropaniques sous quatre intensités d'éclairage

Les teneurs en hyoscyamine et en scopolamine ont été analysées séparément dans les parties aériennes et racinaires (figures 11-12). Le traitement lumineux n'a pas d'effet significatif en terme d'accumulation de H&S dans les organes de la plante quelle que soit la date de prélèvement.

Les concentrations en H&S varient au cours de la culture (figure 13a). Pour tous les traitements, au 18^{ème} jour de culture, la teneur en alcaloïdes, est plus forte qu'au 22^{ème} jour. Cela pourrait être lié au stade phénologique. A 18 jours, les plantes sont encore au stade végétatif et passent ensuite en début de phase reproductive qui induirait un effet de puits créé par les boutons floraux. Quelle que soit la modalité d'éclairage, au 22^{ème} jour, la teneur en H&S dans les parties aériennes et racinaires n'est pas significativement différente.

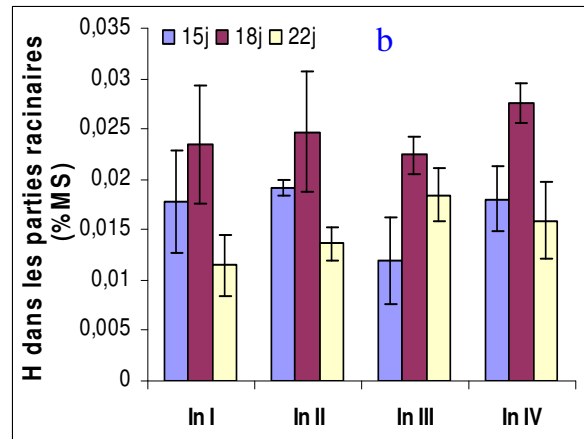
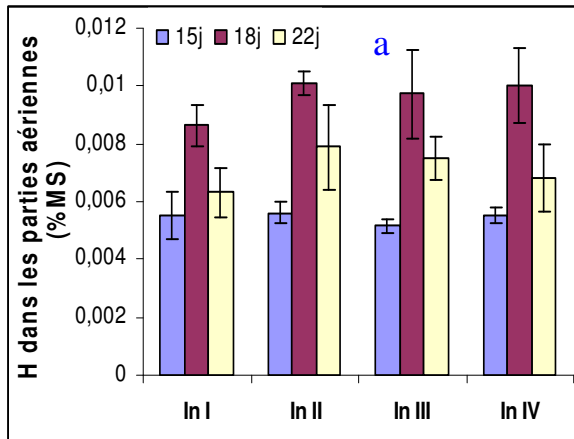


Figure 11: Teneur en hyoscyamine dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'intensité de la lumière.

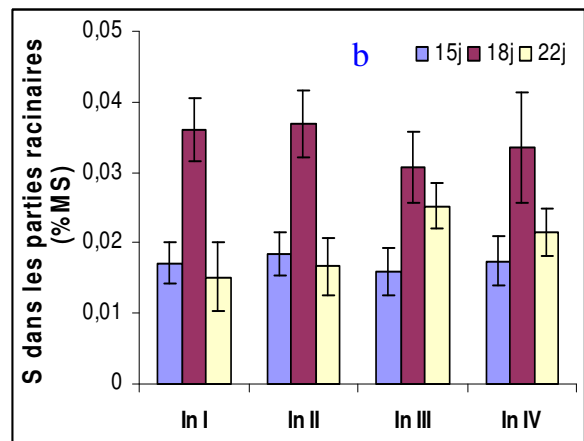
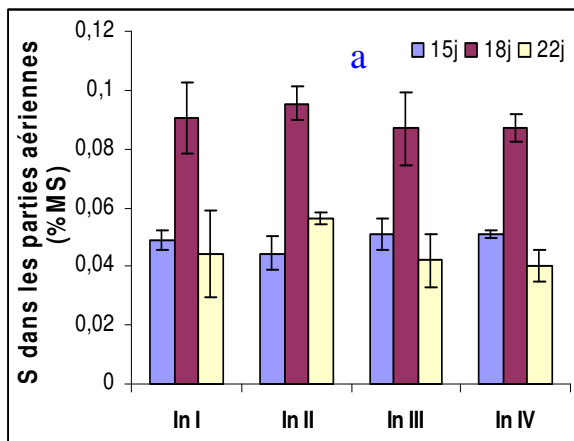


Figure 12 : Teneur en scopolamine dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'intensité de la lumière.

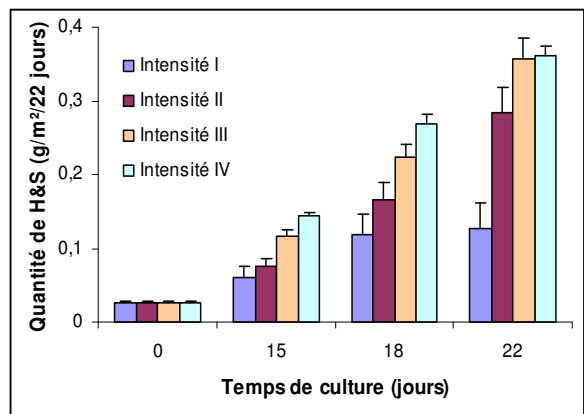
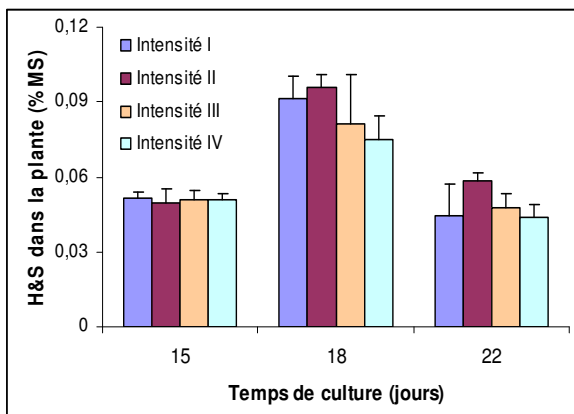


Figure 13a : Teneur en H&S dans la plante en fonction de l'intensité de la lumière.

Figure 13b : Productivité des alcaloïdes dans les plantes au bout de 3 semaines de culture.

De manière générale, les quatre régimes de lumière imposés dans cette étude n'ont pas permis d'obtenir une augmentation notable des teneurs en H&S dans la plante. Cependant, la productivité [déterminée pour une unité de surface (m^2) pendant une unité de temps de culture de 22 jours], a été nettement améliorée. Avec une densité de plantation de $100 \text{ plantes}/m^2$,

cette productivité est de 0,13g de H&S/m²/22 jours pour l'intensité I ; 0,28 pour l'intensité II, et enfin 0,36g H&S/m²/22jours pour l'intensité III et IV (figure 13b). La production des deux métabolites secondaires est donc augmentée de 177% dans les plantes exposées aux intensités III et IV par rapport aux plantes de l'intensité I, la plus faible, et de 29% pour celles de l'intensité II. L'effet est essentiellement lié à l'augmentation de la croissance.

Il y a donc eu amélioration de la production de biomasse mais pas de sa qualité intrinsèque, c'est à dire de sa teneur en H&S.

III-2.4 Discussion et conclusion partielle

La lumière a un effet remarquable sur la croissance et la synthèse de métabolites secondaires et, chez *Datura stramonium*, de nombreux auteurs ont montré que l'intensification de la lumière artificielle a un effet positif sur *i*) la croissance (Chun et Kozai, 2002 ; Dorais et Gosselin, 2002), et *ii*) la production d'alcaloïdes tropaniques (Demeyer et Dejaegere, 1997). Ainsi, les différents régimes d'éclairage décrits dans la littérature ont un effet sur la teneur en alcaloïdes tropaniques dans les feuilles et les tiges. L'intensification de la lumière artificielle améliore la quantité de biomasse et la teneur en molécules d'intérêt dans les plantes médicinales en hydroponie (Léonhart *et al.*, 2002 ; Tran, 2005 ; Afreen *et al.*, 2005), et en sol (Demeyer et Dejaegere, 1997).

Nos résultats montrent clairement que le développement des plantes répond aux conditions du milieu (éclairage renforcé), essentiellement par une augmentation de la vitesse de production de biomasse. On peut dire que le surplus de lumière perçu par les plantes a permis un accroissement de la biomasse mais il n'a pas engendré d'amélioration de la teneur en H&S de la biomasse. Au final, l'augmentation de la biomasse a amélioré la productivité.

Chez *Datura innoxia*, les divers organes n'accumulent pas les mêmes molécules bioactives : l'hyoscyamine est accumulée de façon préférentielle dans les parties racinaires, alors que les tiges feuillées accumulent majoritairement de la scopolamine. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les modalités.

Après avoir réalisé ces travaux sur la "quantité de lumière", nous avons choisi d'évaluer l'effet de la qualité de la lumière.

III-3. Effet de la qualité de la lumière

L'effet potentiel du spectre lumineux sur la croissance des plantes et la synthèse des métabolites secondaires a été testé.

L'expérience a été réalisée dans une serre peu éclairée (exposition nord en période automnale, faible surface vitrée, vitres partiellement opacifiées). Nous avons cultivé des daturas sur radeaux flottants en bacs sous deux éclairages artificiels différents, la distance entre la lampe et le point mesuré est de un mètre:

- ✓ lampes à vapeur de sodium, Philips Son-T Agro 400; spectre orange; intensité d'éclairage de 35500 Lux ;
- ✓ lampes à vapeur de mercure, BTC 250 Riviera, lumière blanche, intensité d'éclairage de 3500 Lux (détail décrit dans matériels et méthodes).

L'ensemble de la culture a été conduit pendant 8 semaines. La hauteur, le nombre de feuilles, la surface foliaire, le diamètre des tiges ainsi que la biomasse des plantes ont été mesurés.

III-3.1 Effet de la qualité de la lumière sur la croissance

Nous avons pu constater un effet de la différence de spectre lumineux sur la croissance de plantes (planches 19-20). Après 8 semaines de culture, la hauteur des plantes sous la lumière blanche n'est ici que de 15 cm, alors que celle des plantes sous lumière orange atteint 34 cm en moyenne (figure 15a). Les tiges des plantes soumises à la lumière blanche ont un diamètre moyen de 0,5cm alors que sous lumière orange il est de 1,3cm (figure 15b).



Planche 19: *Datura innoxia* cultivés en bac pendant 8 semaines sous lumière orange (a : lampes à vapeur de sodium) et sous lumière blanche (b : lampes à vapeur de mercure).



Planche 20 : Racines de *Datura innoxia* cultivés en bac pendant 8 semaines sous lumière orange (a : lampes à vapeur de sodium) et sous lumière blanche (b : lampes à vapeur de mercure).

Le nombre de feuilles varie de 15 à 33 feuilles, et atteint une surface de 280 et 800 cm²/plante en moyenne pour les plantes, respectivement de modalité « lumière blanche » et « orange », (figures 15 c-d). Les plantes à la lumière orange poussent plus rapidement, et tous les paramètres de croissance sont significativement différents de ceux des plantes soumises à la lumière blanche.

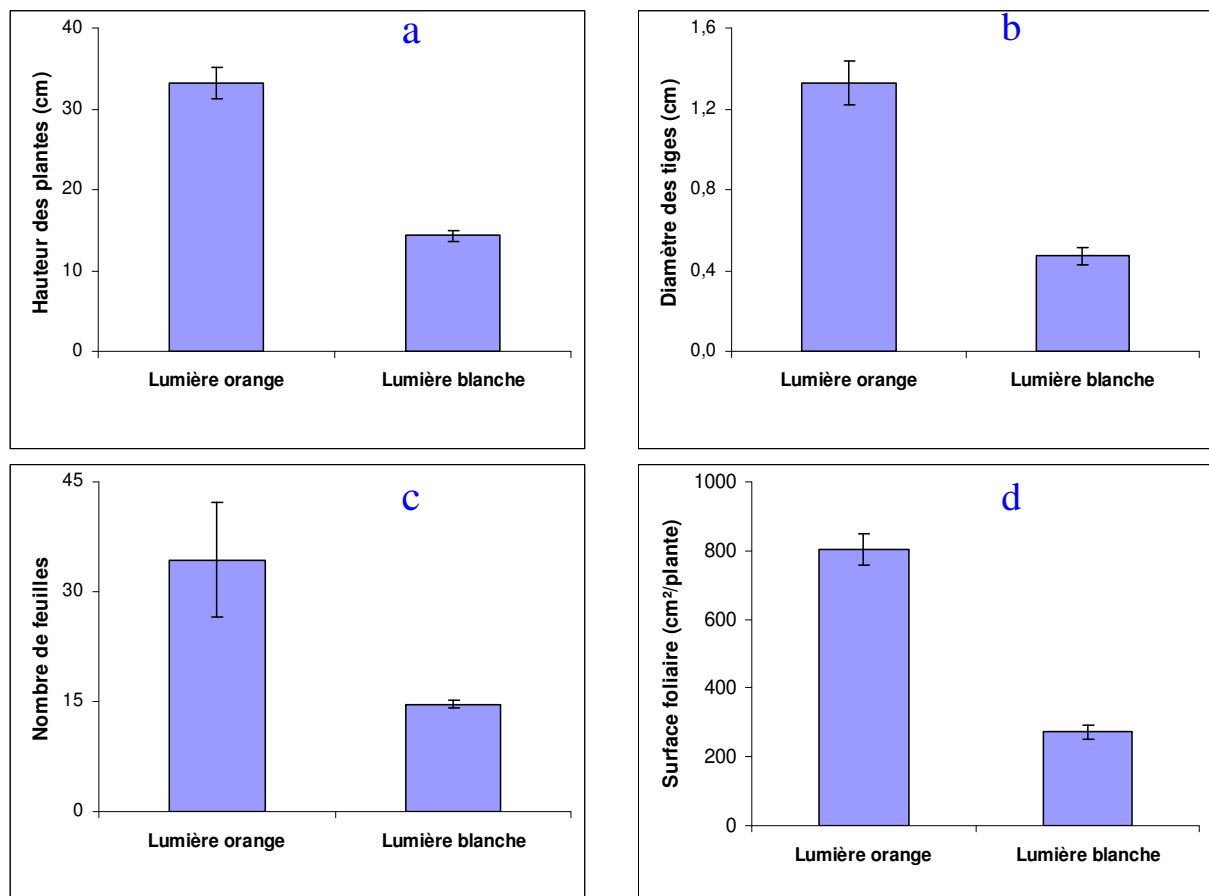


Figure 15 (a-d) : Evolution des paramètres de croissance de plantes de 8 semaines en fonction du spectre lumineux (a: hauteur - b: diamètre des tiges - c: nombre de feuilles - d: surface foliaire).

III-3.2 Effet de la qualité de la lumière sur la production de biomasse

Les plantes sous lumière orange atteignent très vite une biomasse plus importante que celles placées sous lumière blanche. Au bout de 8 semaines, les masses fraîches sont de 15,5 et 2,3kg MF/m², soit 1,37 et 0,16 kg MS/m² (figures 16a-b), sous lumière orange et lumière blanche, respectivement. La biomasse (MF et MS) des plantes en lumière orange est en moyenne 7 fois plus élevée que celles des plantes en lumière blanche. La différence est statistiquement significative (test de Newman-Keuls, seuil $\alpha = 5\%$). La nature du spectre lumineux a donc eu un effet significatif sur le développement et la croissance des plantes hydroponiques.

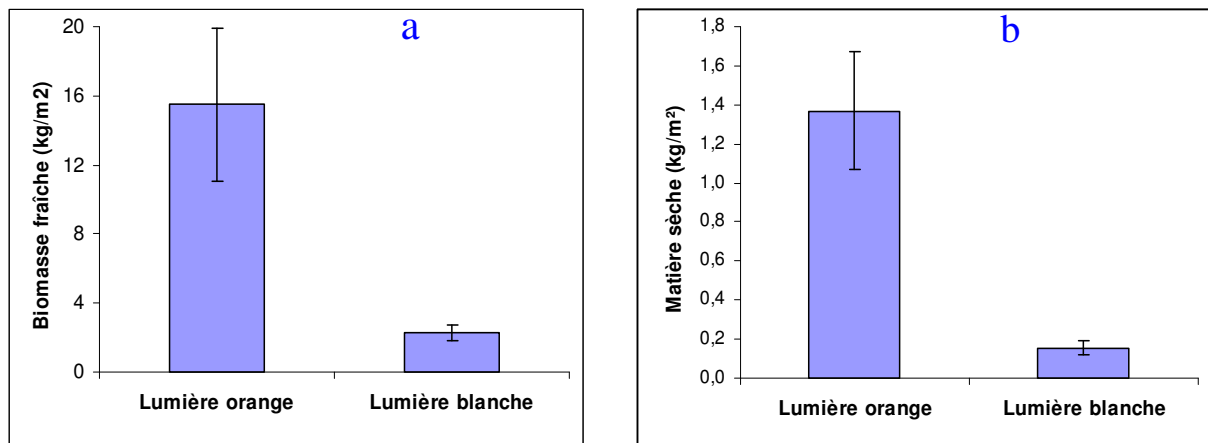
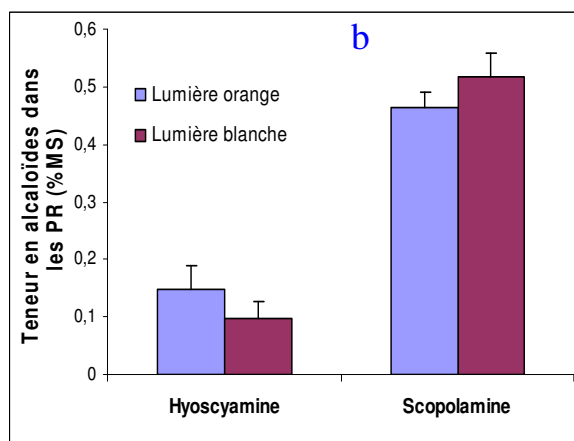
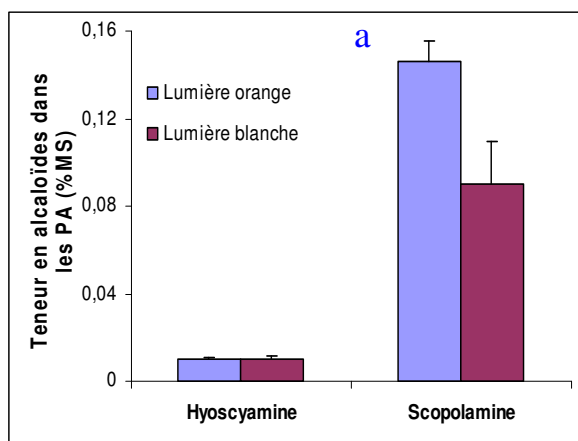


Figure 16 : Biomasse fraîche (a) et sèche (b) des plantes cultivées depuis 8 semaines sous lumière orange et lumière blanche.

Suite à l'analyse de la croissance, nous avons déterminé la teneur en H&S dans les plantes cultivées sous les deux modalités de lumière.

III-3.3 Effet de la qualité de la lumière sur la production d'alcaloïdes tropaniques

Les quantités de H&S ont été analysées. Dans les parties aériennes (figure 17a), la teneur en hyoscyamine est identique sous les deux spectres lumineux, mais une différence est visible au niveau de la scopolamine. Pour les parties racinaires (figure 17b), la teneur en hyoscyamine diminue chez les plantes sous lumière blanche. Si la teneur en scopolamine semble augmenter sous lumière blanche, la différence n'est pas significative.



Figures 17: Teneur en H&S dans les organes de la plante sous deux modalités lumière artificielle, (a) : parties aériennes, (b) : parties racinaires.

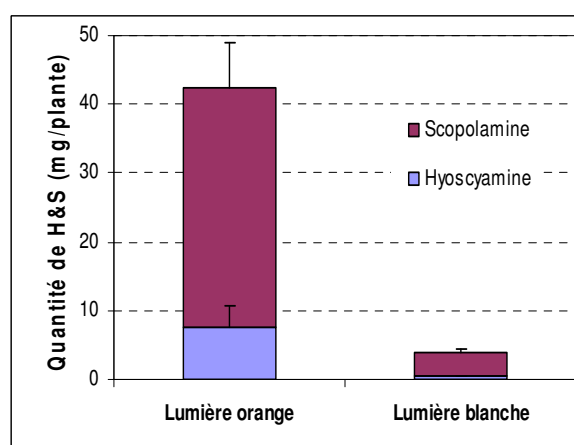
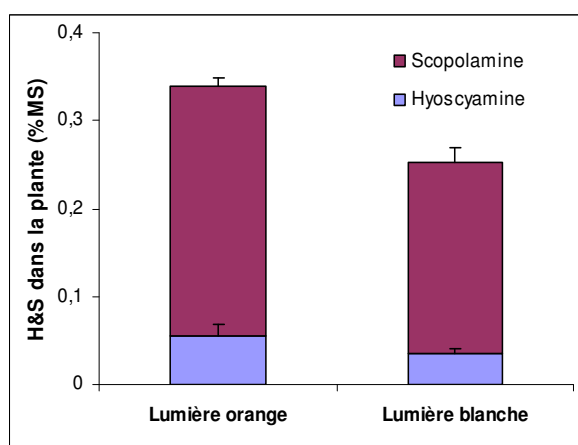


Figure 18a: Teneur en H&S dans la plante entière au bout de 8 semaines de culture sous deux modalités lumière artificielle.

Figure 18b: Quantité d'alcaloïdes dans les plantes au bout de 8 semaines.

Les teneurs en hyoscyamine et scopolamine dans les plantes cultivées sous la lumière orange sont toujours supérieures à celles des plantes cultivées sous la lumière blanche (figure 18a). Nous avons relevé une augmentation de 60% de la teneur en scopolamine dans les parties aériennes des plantes sous la lumière orange par rapport aux plantes sous lumière blanche. La lumière orange contribue donc à améliorer la productivité des alcaloïdes dans la plante. Au bout de 8 semaines, nous avons obtenu 3,87mg de H&S/plante exposée à la lumière blanche et 42,35 mg/plante pour celles sous lumière orange (figure 18b). La teneur en chlorophylles des parties aériennes est par ailleurs moindre chez les plantes soumises à la lumière orangée (figure 19).

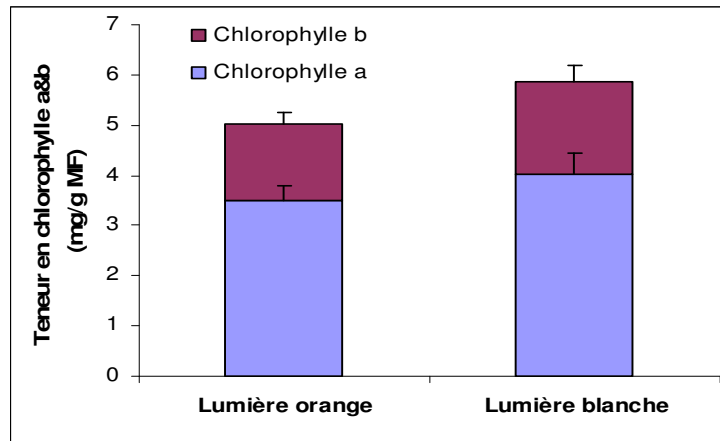


Figure 19 : Teneur en chlorophylle a&b dans les feuilles de plantes depuis 8 semaines de culture sous deux modalités lumière artificielle.

III-3.4 Discussion et conclusion partielle

Des spectres lumineux différents engendrent un changement des paramètres de croissance et d'accumulation de métabolites secondaires chez *Salix myrsinifolia* (Tegelberg *et al.*, 2001) et chez *Glycyrrhiza uralensis* (Afreen *et al.*, (2005). Ces auteurs ont montré une amélioration significative de production de molécules recherchée dans les plantes exposées sous une haute irradiation de UV-B (280-320nm).

Dans notre cas, deux spectres lumineux différents engendrent un changement des paramètres de croissance et des teneurs alcaloïdiques et, par voie de conséquence, un changement majeur en terme de production alcaloïdique totale. Il faut noter que ces valeurs sont plus de dix fois supérieures aux meilleures valeurs obtenues dans l'expérimentation pilote du paragraphe précédent (§: 3/Effet de l'intensité de la lumière). La durée de culture pour l'expérience sur l'intensité de la lumière est de 3 semaines (T°C moyenne de 27,4°C le jour et de 19,6°C la nuit) alors que les cultures de deux spectres se prolongent jusqu'à 8 semaines (T°C jour : 25-27 ; nuit : 13-15°C). On peut donc se demander si les très hautes valeurs obtenues ici ne seraient pas aussi en partie liées à d'autres facteurs dont des température relativement fraîches la nuit.

III-4. Effet combiné de la température et de la lumière

La température est un des facteurs environnementaux qui influence fortement la croissance des plantes (Abdelhafeez *et al.*, 1971 ; Harssema, 1977 ; Tindall *et al.*, 1990) . Elle joue un rôle sur les activités enzymatiques, les réactions chimiques (Hopkins, 2003), et agit sur la fluidité des membranes cellulaires (Tran, 2005). La réponse de la plante dépend de la

température perçue au niveau des parties aériennes ainsi qu'au niveau racinaire. La photosynthèse et la respiration répondent de façon très différente à la température. La vitesse de la respiration continue d'augmenter avec la température, elle atteint un maximum généralement vers 50°C puis diminue brutalement par suite de l'inactivation des enzymes (Hopkins, 2003).

Ainsi, la température du substrat a une action essentielle sur la croissance et le développement. Les travaux effectués en culture hydroponique par Cornillon (1985) et Samia (1992) ont permis de noter l'influence majeure de la température sur la vitesse de diffusion de l'oxygène dans du milieu nutritif. Par ailleurs, la température semble pouvoir jouer un rôle favorable direct sur la production de métabolites secondaires (Bourgaud, 1990). Pour ces raisons, nous avons choisi de tester en combinaison, l'effet:

- de la température ambiante,
- de la température de la solution nutritive, et,
- de la lumière,

sur la croissance des plantes et l'accumulation d'alcaloïdes dans les cultures hydroponiques. Au travers de cette étude, nous avons aussi déterminé l'impact des facteurs testés sur la microflore totale dans la solution nutritive et sur son activité en regard des alcaloïdes d'intérêt (vitesse de dégradation de H&S mesurée par estimation de la demi-vie des molécules).

III-4.1 Description du dispositif expérimental

Des cultures hydroponiques en bacs PVC, ont été mises installées dans deux serres (planche 21) et le dispositif, testé sur 7 semaines, est constitué de quatre modalités :

- Modalité A : cultures en serre chauffée (serchau)
- Modalité B : cultures en serre chauffée, avec lumière renforcée (serchaulu)
- Modalité C : cultures en serre froide (serfroi)
- Modalité D : cultures en serre froide, et la solution nutritive chauffée au bain-marie à environ 20°C (serfroisolchau).

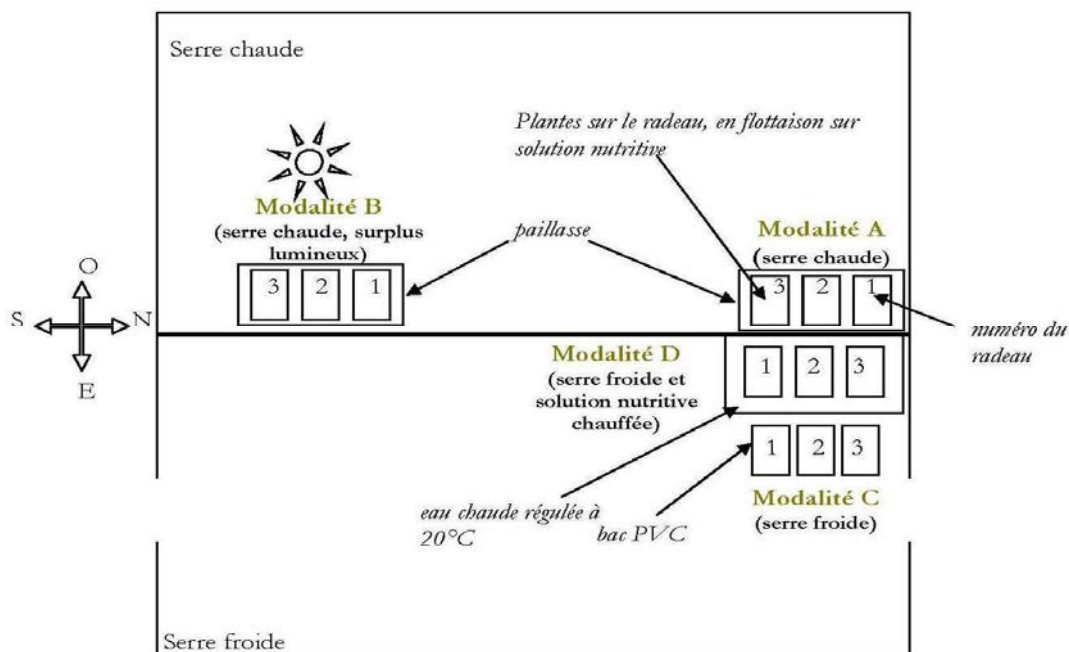


Planche 21: Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la réalisation de cultures hydroponiques selon 4 modalités (A,B,C,D) dans deux serres: une serre "chaude" (A,B) et une "froide" (C,D) avec supplément de lumière pour la modalité (A) et chauffage de la solution nutritive à 20°C par bain marie pour la modalité (D). Trois bacs de cultures regroupant 15 plantes chacun sont numérotés 1, 2 ou 3 et constituent chaque modalité.

Chaque modalité comprend trois bacs de quinze plantes sur un radeau. Les modalités A (serchau) et B (serchaulu), placés sur des paillasse à une hauteur de 65 cm du sol, sont disposées dans une serre chauffée. La température de cette serre est régulée entre 18 et 35°C (consignes: chauffer jusqu'à 18°C, ventiler à partir de 35°C) comme décrit dans « matériels et méthodes ». Les plantes de la modalité B (serchaulu) reçoivent un éclairage supplémentaire, par des lampes à vapeur de mercure, pendant 10 heures (de 8 h à 18 h), en complément de la lumière du jour (photopériode d'avril soit #12H). Les bacs de culture des modalités C (serfroi) et D (serfroidsolchau) se trouvent dans une serre froide (température ambiante, sans chauffage). Ils sont posés à même le sol. Ceux de la modalité D (serfroidsolchau) sont plongés dans un bain-marie, régulé à 20°C par une résistance chauffante (planche 22).



Planche 22 : Dispositif de culture utilisé en serre pour tester l'effet combiné de la température et de la lumière selon 4 modalités: plantes de modalité A (serchau), Modalité B (serchau), Modalité C (serfroid) et modalité D (serfroisolchau) au bout de 4 semaines de culture.

III-4.2 Contrôle du climat et variables climatiques de l'expérience

Tout au long de la culture, les données de température de l'air sont relevées par les thermomètres situés au centre des deux serres. Ces données, comprenant les températures maximale, minimale, et celle mesurée entre 12h et 14h, sont prises tous les jours. L'enregistrement du rayonnement incident est réalisé à l'aide d'un *Portable Photosynthèse System, LI-6200 Primer* (LI-Cor Inc). Il est mesuré à 10h, avec et sans lumière renforcée, à une hauteur de 40-50cm au dessus du bac. La différence entre les deux moyennes des intensités lumineuses montre un apport de lumière de $105\mu\text{mol}$ de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (annexe 9). Parallèlement, les températures de la solution nutritive sont mesurées, toutes les 15 minutes, à l'aide de capteurs (HOBO, U12-012), disposés horizontalement à-côté des bacs de culture, et reliées à des sondes plongées dans les bacs.

Dans la serre chauffée, la température de l'air est contrôlée par un automatisme qui déclenche le chauffage lorsque la température descend en dessous de 18°C , et aère la serre au-

dessus de 35°C (soufflants motorisés). Pour A, B et C, les températures des solutions nutritives ne sont pas régulées, contrairement à la modalité D (serfroisolchau).

Le climat enregistré pendant l'expérience se caractérise par un rayonnement photosynthétiquement actif (PAR) élevé durant la première semaine, suivi par une semaine de temps pluvieux avec de nombreux passages nuageux, rendant le rayonnement très instable. La dernière semaine a de nouveau été très ensoleillée. Sur l'ensemble de l'expérience, nous avons obtenu une température moyenne de l'air, dans la serre chauffée, de 26°C, alors que dans la serre froide, cette valeur n'atteignait que 20°C (figures 20-21).

L'amplitude de variation de la température moyenne de l'air entre la serre chauffée et la serre froide est de 6°C et celle des solutions des modalités D et C est de 3°C (figure 23 et tableau 6). Les valeurs données ici sont des moyennes. L'homogénéité des températures entre les bacs de solution des modalités A, B et D a été enregistrée, mais pas celle de la modalité C. Nous avons confirmé cette différence significative par une comparaison de moyennes de Newman-Keuls (seuil $\alpha=5\%$) (tableau 6).

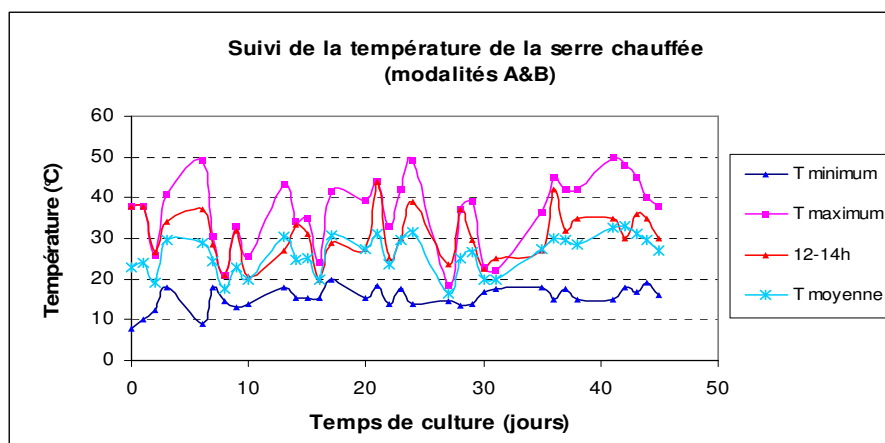


Figure 20: Evolution de la température de l'air dans la serre chauffée (modalités A&B) : température minimale (T minimum), maximale (T maximum), entre midi et quatorze heures (12-14h) et moyenne de minimale et maximale (T moyenne).

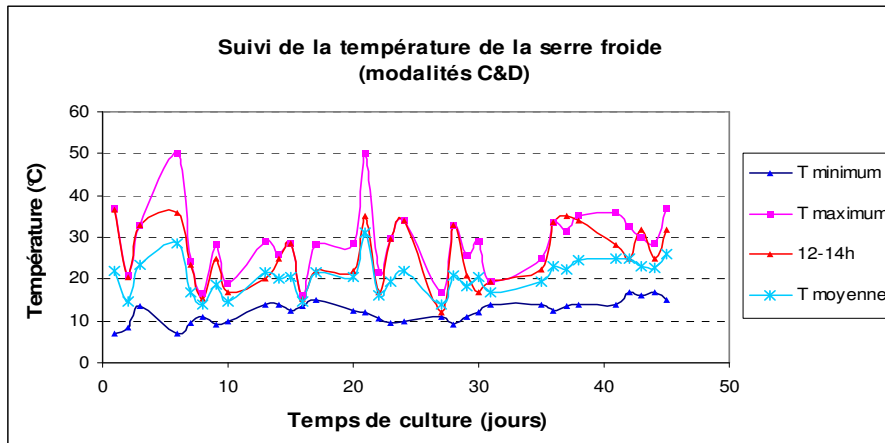


Figure 21 : Evolution de la température de l'air dans la serre froide (modalités C&D).

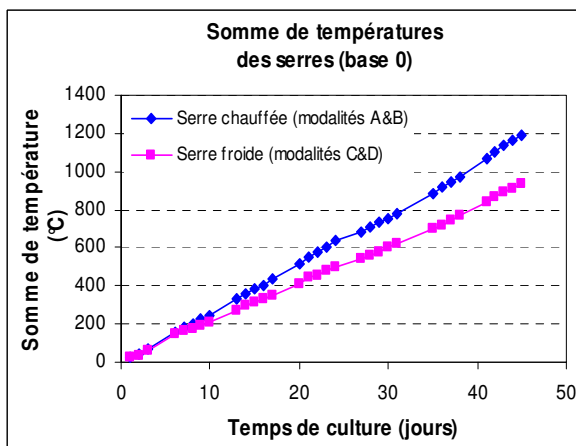


Figure 22a : Somme de température de l'air des serres = $f(t)$.

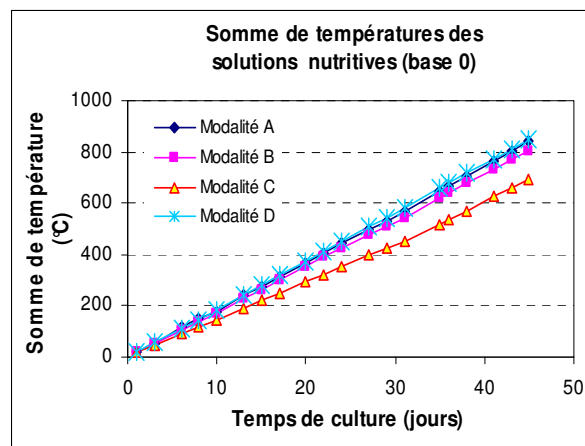


Figure 22b : Somme de température des solutions nutritives = $f(t)$.

Mise en évidence de la différence de température de l'air, entre les 2 serres, par passage en somme température = $f(t)$.

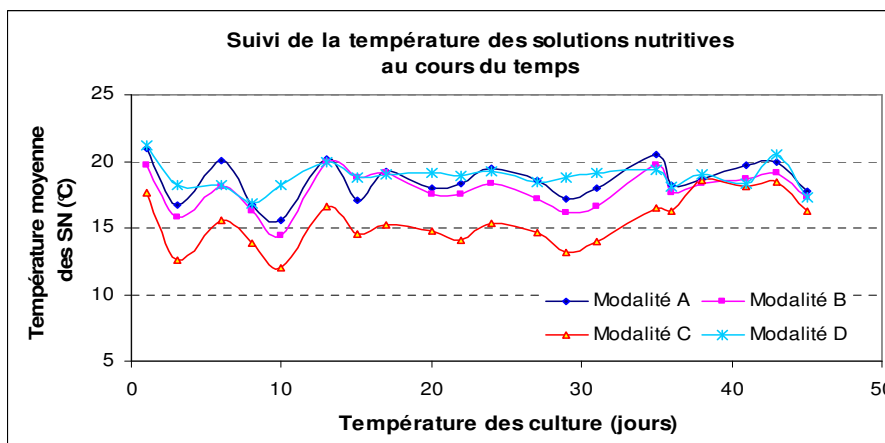


Figure 23 : Evolution de la température des solutions nutritives pour les 4 modalités testées: A=serchau, B=serchau, C=serfroi, D=serfroidolchau.

F1	Libelles	Moyennes	Groupes homogènes	
4	ModD	18,83	A	
1	ModA	18,55	A	
2	ModB	17,82	A	
3	ModC	15,41		B

Tableau 6: comparaison de la température (°C) moyenne des solutions nutritives (test de Newman-Keuls, seuil $\alpha=5\%$).

III-4.3 Influence des paramètres environnementaux sur la croissance des plantes

Nous avons cherché à savoir s'il existe une relation entre la croissance (surface foliaire, hauteur des plantes, morphologie racinaire) et les paramètres environnementaux (température de l'air, de la solution nutritive, et la lumière) pour les quatre modalités de culture.

III-4.3.1 Influence de la lumière complémentaire

Les modalités A et B sont placées dans la même serre et ont subi les mêmes variations climatiques. La modalité B a reçu un supplément de lumière artificielle estimé à $105 \mu\text{mol}$ de photons/m²/s, fourni par deux lampes situées au dessus des bacs de culture. Pour ces deux modalités (A et B), les paramètres de croissance de la partie aérienne des plantes (hauteur, diamètre des tiges, surface foliaire, MF et MS) suivent la même évolution en trois phases :

- ✓ une phase de croissance lente, les 20 premiers jours,
- ✓ une phase d'accélération de la croissance jusqu'au 35^{ème} jour, et
- ✓ une dernière phase où la croissance se ralentit jusqu'à la fin de l'expérience.

Au bout de 7 semaines, la hauteur des parties aériennes atteint, respectivement, 43cm et 55cm pour les plantes des modalités A (serchau) et B (serchaulu) (figure 24a). Pour la modalité B, le diamètre des tiges est supérieur à celui de la modalité A (figure 24b). Les deux courbes restent néanmoins très proches tout au long de l'expérience.

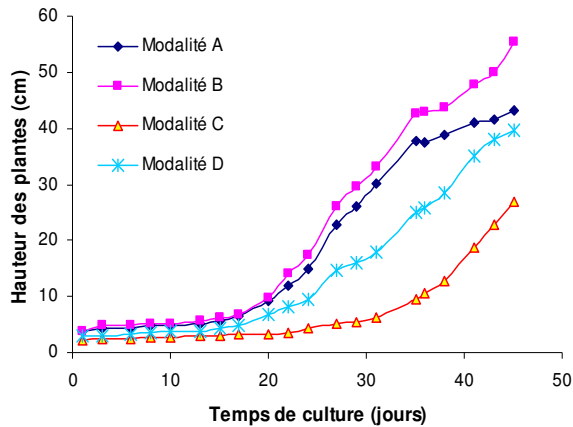


Figure 24a : Hauteur de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

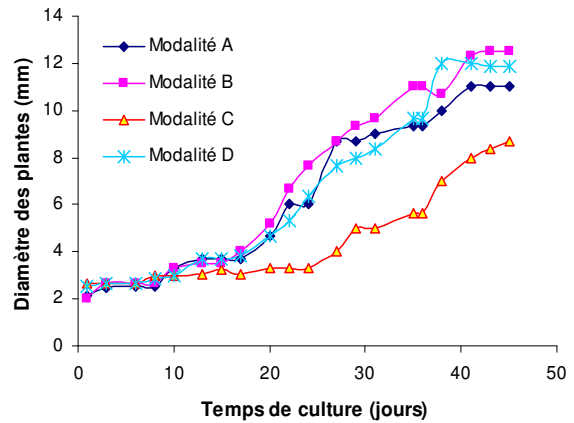


Figure 24b : Diamètre des tiges de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

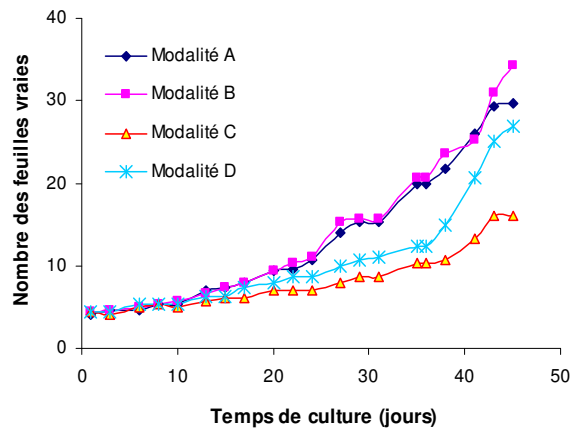


Figure 25a: Nombre de feuilles de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

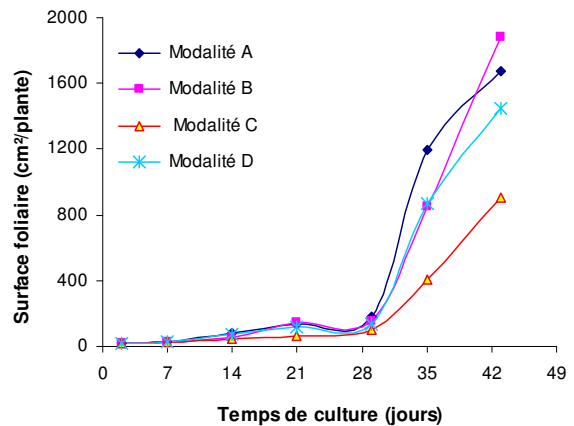


Figure 25b : Surface foliaire de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

La surface foliaire et le nombre de feuilles augmentent fortement au cours du temps pour atteindre respectivement 1600 cm² pour 30 feuilles par plante, pour les deux modalités A et B (figures 25a-b).

La croissance a été analysée à partir des deux parties de plantes, par des prélèvements destructifs (MF et MS). Dans cette expérience, le traitement avec complément de lumière (serchaulu) n'a pas d'effet sur le rendement en matière fraîche et en masse sèche totale, quelle que soit la date de récolte considérée (figures 26a-b). Cela peut être la conséquence de l'éclairage naturel particulièrement important dans la serre ENSAIA durant l'expérience. Le complément de lumière n'aurait pas présenté d'avantage (effet très marginal sans impact sur le rendement en biomasse), contrairement aux essais décrits préalablement et réalisés en hiver

dans une serre peu lumineuse et offrant une faible surface vitrée très opacifiée. Dans ce système expérimental, l'apport de lumière artificielle conduit à une croissance racinaire plus faible. Il semblerait que, sous la lumière renforcée, les plantes allouent préférentiellement leur photoassimilats aux parties aériennes et restreignent leurs parties racinaires, ce qui aurait comme conséquence de favoriser encore plus la photosynthèse nette.

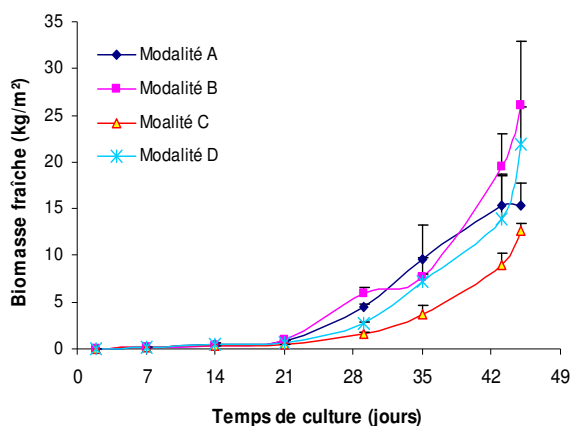


Figure 26a : Biomasse fraîche de plantes au cours du temps pour quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

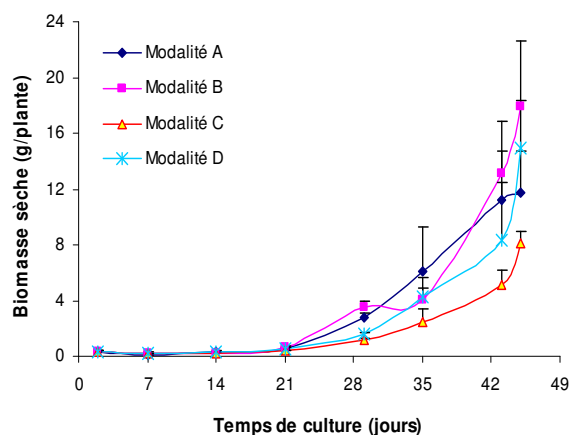


Figure 26b : Masse sèche de plantes au cours du temps pour quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

III-4.3.2 Influence de la température dans les serres

Les plantes des modalités A et B sont situées dans une serre chauffée, contrairement aux cultures des modalités C et D dans la serre froide. La différence moyenne de température est d'environ 6°C et cette différence s'est maintenue pendant une grande partie de l'expérience. Les bacs de la modalité D sont, par ailleurs, placés dans un grand bain-marie, qui maintient la solution nutritive à une température de 18-20°C.

La cinétique de croissance de biomasse de plantes des deux modalités A (serchau) et C (serfroi), évolue de la même façon lorsqu'on se réfère à la somme des températures (figure 27). Au niveau de la hauteur et du diamètre des tiges (figures 24a-b), toutes les modalités connaissent d'abord une croissance lente qui dure 20 jours, puis s'accélère de manière plus marquée jusqu'au 35^{ème} jour. A partir de cette dernière date, la croissance s'est ralentie et demeure constante jusqu'à fin de l'expérimentation.

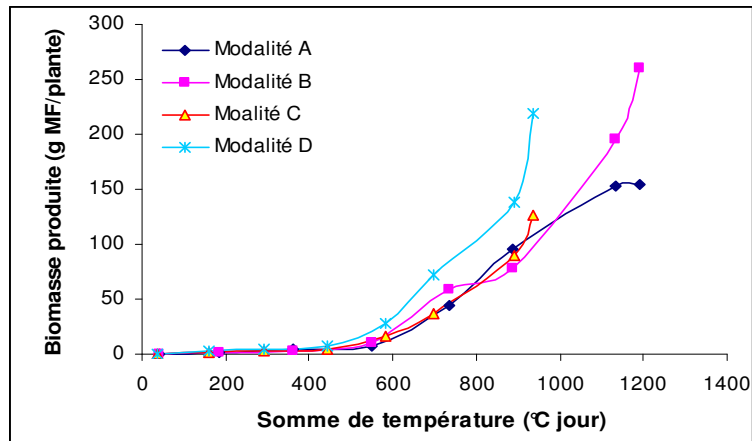


Figure 27: Biomasse moyenne des plantes en fonction de la somme des températures de la serre (Modalités: A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

La surface foliaire des plantes cultivées dans la serre chauffée (modalité A) est supérieure à celle des plantes cultivées dans la serre froide (modalité C) (figure 25b). A la dernière semaine de culture, les plantes des modalités A ont des feuilles deux fois plus grandes que celles de la modalité C. Cette valeur atteint 1550 cm^2 pour les modalités A, alors que celle des modalités C ne gagne que $800 \text{ cm}^2/\text{plante}$. Ce résultat relatif se reproduit pour tous les autres paramètres étudiés.

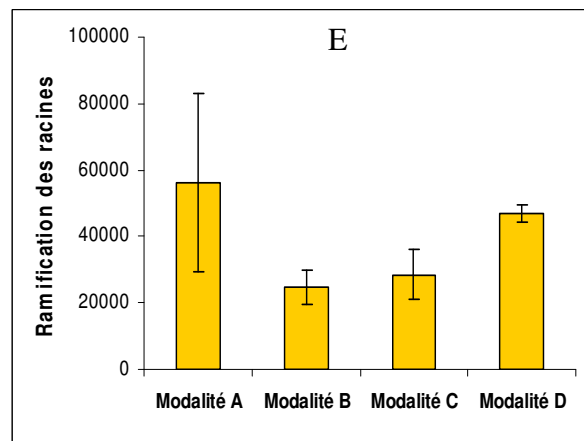
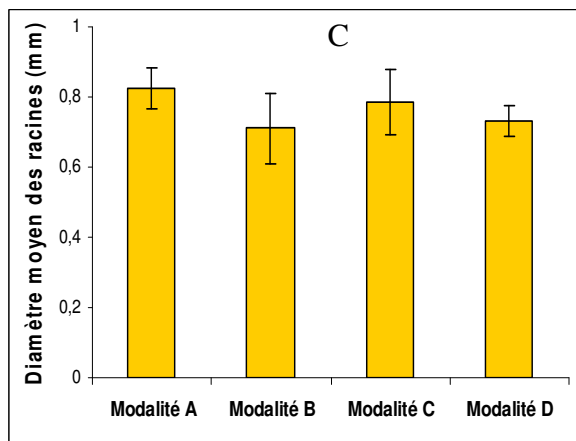
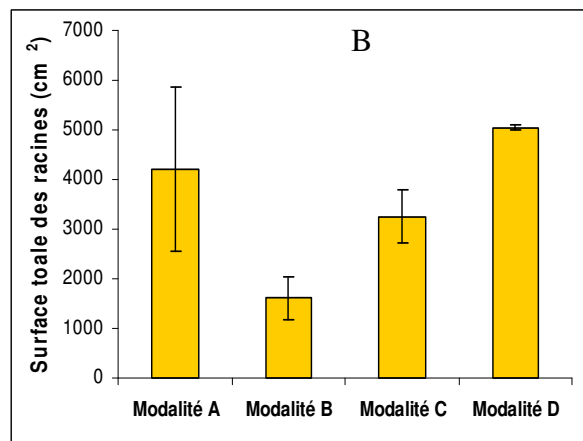
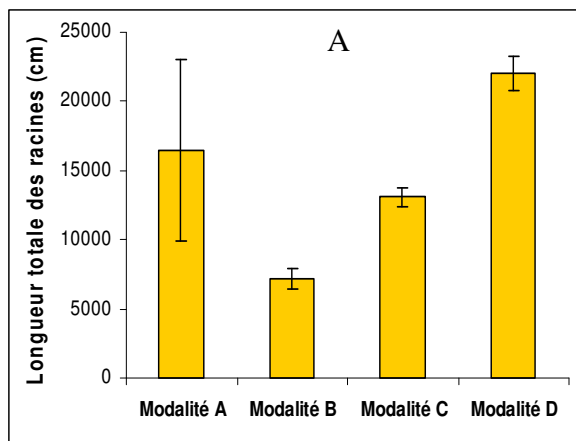
De manière générale, pour tous les paramètres, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les modalités A et C durant les toutes premières semaines de culture. La croissance des parties aériennes de la modalité A devient supérieure à celle de la modalité C à partir du 30^{ème} jour de culture. De la même manière, à ce stade, la hauteur, le diamètre, la surface foliaire, le nombre de feuilles, ainsi que la matière fraîche et sèche des plantes de la modalité A sont significativement plus forts que ceux de la modalité C. L'effet de la température ambiante (température de l'air) se retrouve au niveau des organes aériens (tiges feuillées), et se traduit par un bon rendement en biomasse aérienne qui représente 75-80% de la biomasse totale des plantes. Les conditions de culture de la serre chauffée semblent donc plus propices à un meilleur développement de la partie tiges feuillées.

III-4.3.3 Influence de la température dans la solution nutritive

Pour évaluer l'effet de la température de la solution nutritive, dans un premier temps, nous allons comparer les cultures des modalités C (serfroi) et D (serfroisolchau), qui ont été placées en serre froide dans les mêmes conditions microclimatiques. La croissance des parties

racinaires (utilisation du logiciel WinRHIZO) nous montre des différences au niveau morphologique, entre les plantes des modalités C et D (figure 28).

La longueur moyenne des racines de la modalité D est 1,7 fois supérieure à celle des racines de la modalité C. En effet, elle s'étend sur 13000 cm/plante en moyenne pour C et 22000 cm/plante pour D. La surface moyenne des racines de la modalité D est aussi 1,56 fois supérieure à celle de la modalité C (5000 contre 3200 cm²/plante). De même, la biomasse, le volume, le taux de ramification et le nombre d'apex racinaires des plantes de la modalité D sont plus élevés que ceux de la modalité C (figure 28).



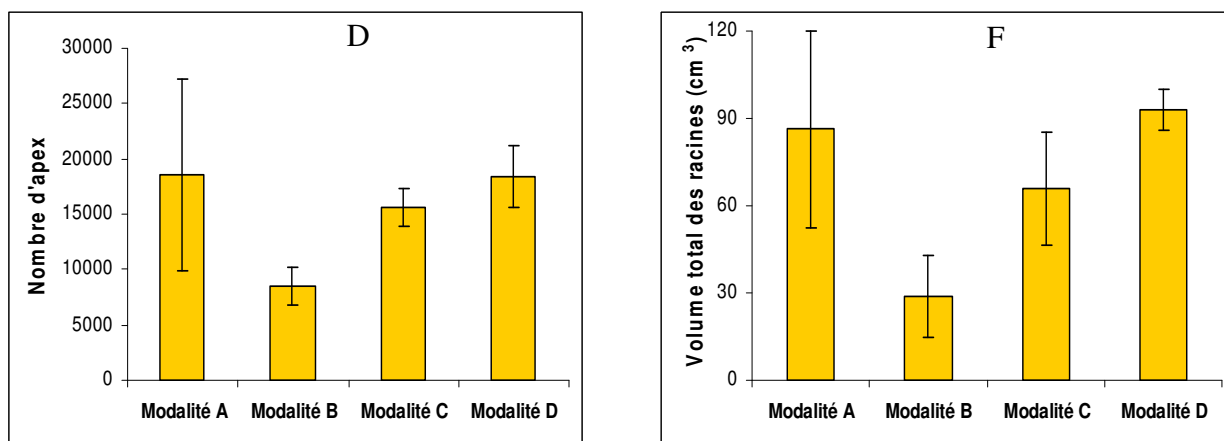


Figure 28: Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramification (E) et volume total (F) des racines de plantes cultivées depuis 35 jours en bac hydroponique sous différentes conditions d'environnement (modalitéA: serchau, modalitéB:serchaulu, modalitéC:serfroi, modalitéD:serfroisolchau).

La température de la solution nutritive a donc un rôle important sur la croissance racinaire des plantes. Une température inférieure à 20°C réduit la croissance dans le cas de la modalité C.

En effet, une élévation de température de 3°C donne un avantage significatif aux plantes de la modalité D par rapport à celle de la modalité C par rapport à celles de la modalité C. Le maintien de la solution nutritive à une température moyenne de 18-20°C permet aux plantes d'atteindre un développement semblable à celui des plantes cultivées en serre chauffée.

Par contre, une température de serre plus élevée (modalité A) ne permet pas un développement plus important du système racinaire. Les conditions de culture en serre chauffée semblent favoriser le développement de la biomasse aérienne. En effet, les indices de croissance de la partie racinaire de la modalité A sont aussi inférieurs à ceux de la modalité D. Le "réchauffement" relatif de la solution nutritive a favorisé une stimulation du développement racinaire, qui devient quasiment équivalent à la masse totale de la plante obtenue en chauffant toute la serre (*i.e.* modalité A).

Ces résultats nous ont permis de prouver que la température de la solution nutritive joue vraiment un rôle primordial dans le développement des plantes en culture hydroponique, notamment au niveau racinaire. La maintenance d'une température optimale de la solution nutritive semble être une alternative à privilégier en vue d'une application industrielle à la technologie « Plantes à Traire »; une solution qui nécessite un investissement moins important que le chauffage complet de la serre qui induit plus de déperditions de chaleur.

III-4.4 Influence des paramètres environnementaux sur la production de métabolites secondaires

Après avoir analysé l'influence des paramètres environnementaux sur la croissance, le développement des plantes, ainsi que sur la modification morphologique du système racinaire, nous avons mesuré la teneur et la quantité de H&S par plante en fonction du temps.

Après quatre semaines, nous avons obtenu des teneurs de 0,08-0,09% de H&S par 100g de matière sèche pour les trois modalités A, B et D, alors que celle des plantes de la modalité C n'est que de 0,04%MS (figure 29a). De la même manière, au bout de sept semaines de culture, nous avons obtenu une valeur moyenne de 0,1%MS de H&S pour les modalités A, B et D et 0,04%MS pour la modalité C (figure 29b). Visiblement, l'investissement énergétique consenti pour augmenter la température du milieu de culture (air ou solution nutritive) a permis d'améliorer de 2 à 2,5 fois la teneur en H&S dans les plantes.

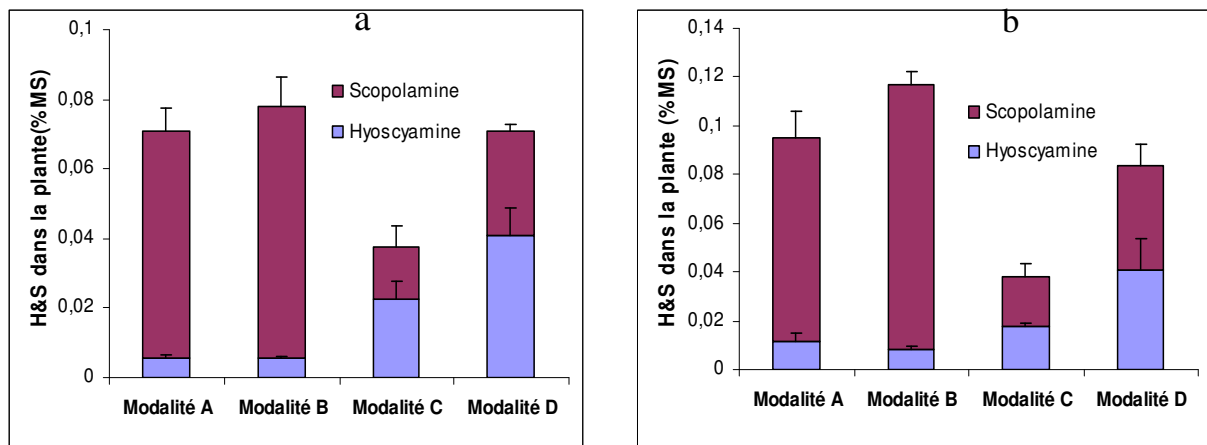


Figure 29: Teneur en H&S dans la plante après 4 (a) et 7 semaines (b) de culture.

L'accumulation d'hyoscyamine et de la scopolamine dans les plantes de toutes les modalités se distingue au niveau du rapport S/H. Pour les modalités A&B, il est de 11-12 à quatre semaines puis, diminue à 5-7 au bout de sept semaines (figures 29a-b). Pour les plantes des modalités C&D, le rapport S/H s'est maintenu entre 0,6-0,7 pour toutes les plantes de quatre ou sept semaines (figures 29a-b).

La culture en serre chauffée et l'ajout de lumière favorisent le développement de la biomasse aérienne, ce qui, en conséquence, induirait l'augmentation de la quantité de scopolamine et donc l'augmentation du ratio S/H.

On observe un phénomène inverse pour les plantes des modalités C&D, où la partie racinaire s'est développée de manière plus importante que la partie aérienne. Cela a un impact

sur les quantités produites de H&S (figures 30a-b). La température plus élevée de la solution nutritive des plantes de la modalité D a permis la croissance plus importante du système racinaire par rapport à la partie aérienne, et ce différentiel se retrouve, par conséquence, dans le rapport S/H.

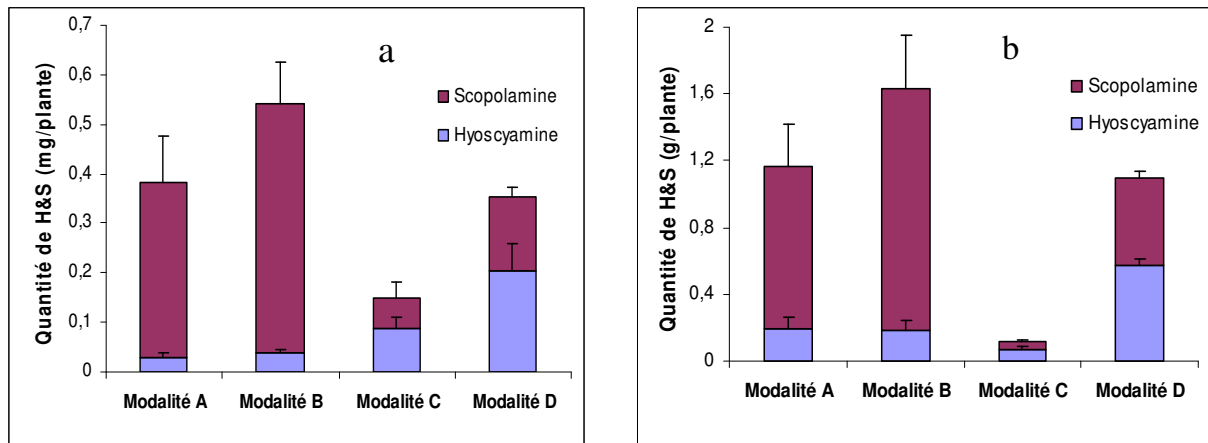


Figure 30: Quantité de H&S dans la plante au bout de 4 (a) et 7 semaines (b) de culture.

III-4.5 Influence des paramètres environnementaux sur les microorganismes présents dans la solution nutritive

Dans les conditions hydroponiques testées au cours de nos travaux, les plantes sont cultivées en conditions non stériles. Sachant que les systèmes racinaires végétaux exsudent des composés organiques (Nguyen, 2003), il semble évident, à priori, que des microorganismes peuvent se développer dans la solution nutritive. Au cours de l'expérimentation décrite ci-dessus, la solution nutritive a été prélevée chaque semaine et étalée sur milieu TSA selon une gamme de dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} . Le dénombrement des colonies a été effectué après 24 et 48h de culture à 28°C.

La densité initiale de la microflore ne présente pas de différence significative, quelle que soit la modalité, mais elle varie au cours du temps (figure 31). La microflore de la modalité D présente une évolution assez régulière par rapport aux autres modalités. Les courbes de dénombrement de colonies microbiennes réalisées à 24h et à 48h d'incubation ont le même profil. Dans ce cas, l'évolution de la microflore semble être corrélée aux variations de la température de la solution nutritive.

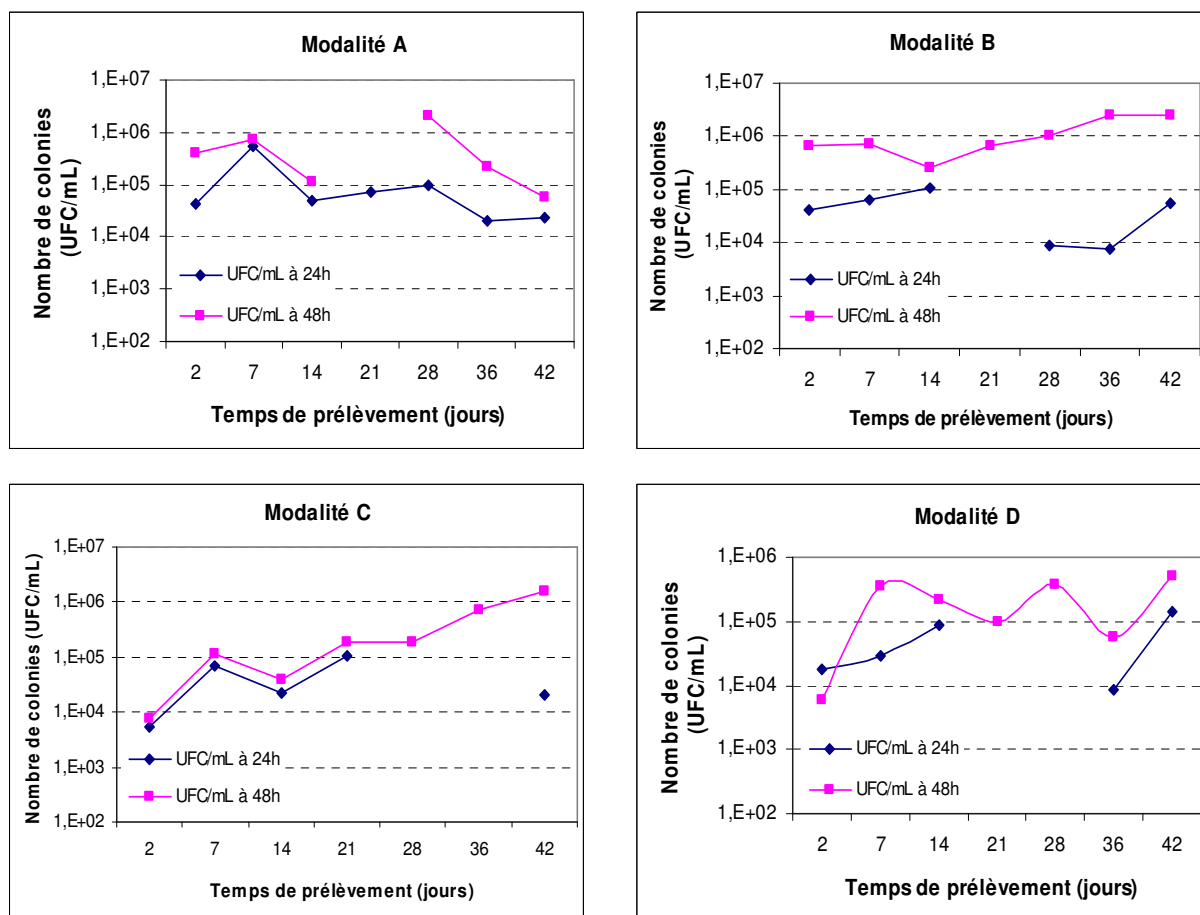


Figure 31: Evolution de la microflore dans les solutions nutritives au cours du temps de culture des plantes sous différentes conditions environnementales; modalité A : serchau, modalité B : serchaulu, modalité C : serfroi, modalitéD : serfroisolchau).

D'un point de vue qualitatif, nous avons observé une grande diversité de colonies se formant au cours de l'incubation sur milieu gélosé. De vingt à trente types de colonies différentes peuvent être distingués d'après leur forme, leur couleur et leur aspect (planche 23).

Une analyse microbiologique plus poussée en utilisant des galeries API, des plaques Biolog ou bien des analyses chimiques de type PLFA-FAME profiling (phospho-Lipid Fatty Acid-Fatty Acid Methyl Esters profiling) ou moléculaires de type RISA auraient pu nous permettre de déterminer au moins partiellement quels types de microorganismes sont présent dans nos solutions nutritives. Comme nous le verrons dans la suite, nous avons délibérément fait le choix de ne pas pousser plus avant nos investigations pour focaliser nos efforts sur d'autres aspects du sujet.

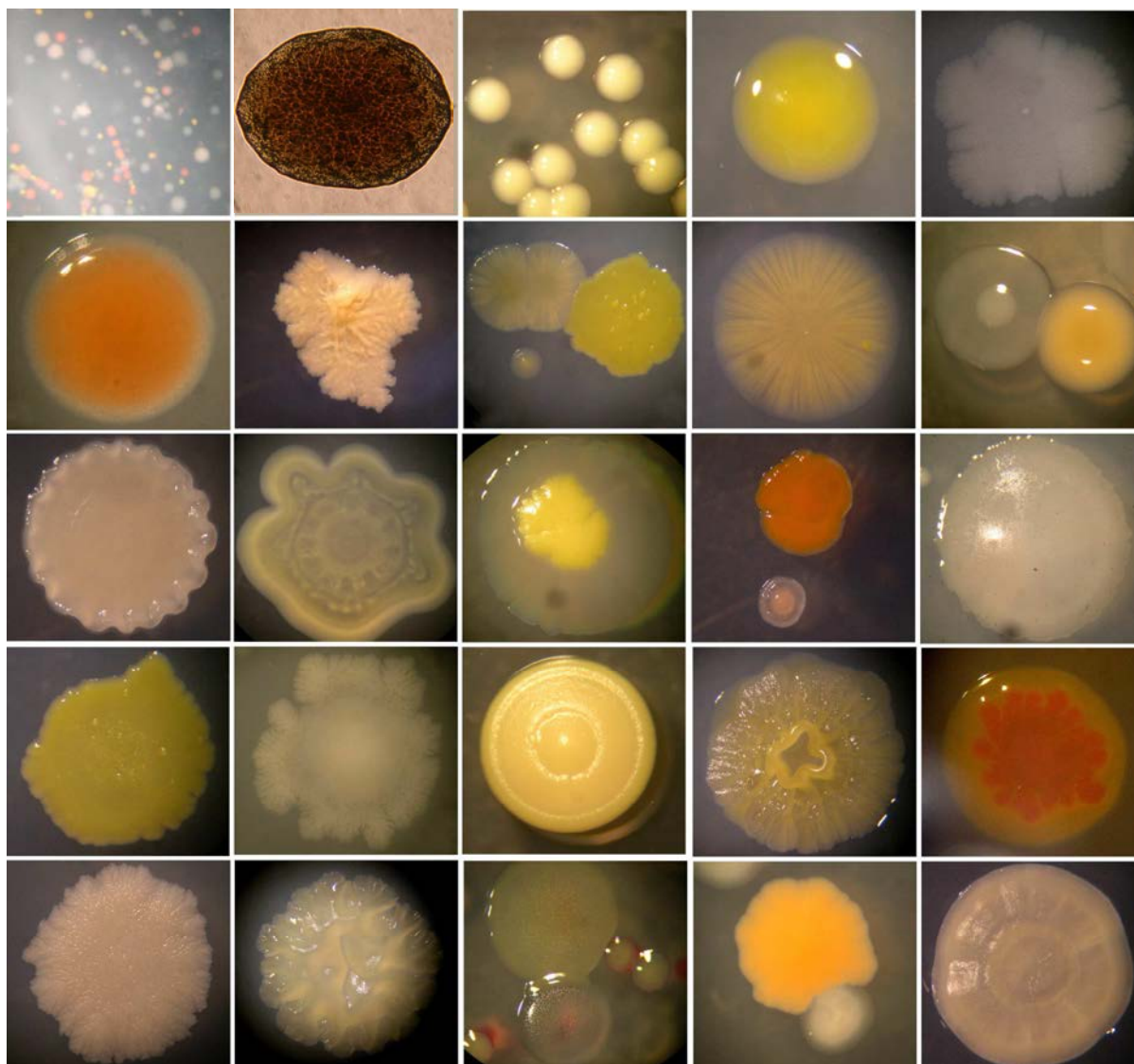


Planche 23: Analyse microscopique de la diversité des colonies microbiennes présentes dans le milieu de culture hydroponique et poussant sur le milieu TSA (grandissement X100).

III-4.6 Effet de la microflore de la solution nutritive sur la dégradation des alcaloïdes tropaniques

Partant du principe que nos plantes exsudent des composés facilement métabolisables ainsi que des métabolites secondaires susceptibles de présenter des activités biocides ou biostatiques, on peut imaginer que les populations microbiennes se développant dans les solutions nutritives vont "s'adapter" aux composés végétaux qu'elles rencontrent. Seuls des bactéries ou champignons "résistants" aux métabolites secondaires pourront voir leur population croître. La résistance peut passer soit par une absence complète d'effet, soit par une capacité à dégrader les métabolites secondaires qui est à considérer comme une molécule toxique pour le microorganisme. Ainsi, le composé peut être soit dégradé (catabolisé) soit

inactivé par une réaction biochimique quelconque (oxydation à l'aide de cytochromes P450, méthylation ...). Pour tenter d'obtenir des éléments quant à cette hypothèse de fonctionnement du système hydroponique, nous avons réalisé des tests visant à déterminer la stabilité des métabolites secondaires dans la solution nutritive.

Au cours de l'expérimentation décrite dans les paragraphes précédents, la vitesse de dégradation des alcaloïdes tropaniques a été suivie par incubation de H&S dans un échantillon de solution nutritive prélevée chaque semaine (3 témoins + 3 répétitions) pour chaque modalité. Ensuite, via ces résultats, nous avons estimé le temps de demi-vie* de molécule (en heures) en fonction de l'âge de la culture hydroponique.

**La demi-vie d'une molécule représente le temps au bout duquel il restera seulement la moitié de la quantité initiale de cette molécule ajoutée dans la solution d'incubation.*

Cette technique d'incubation permet de déterminer si la microflore présente dans le milieu nutritif dégrade ou non les alcaloïdes tropaniques. Elle doit permettre d'évaluer aussi l'impact d'une dégradation éventuelle sur la production d'alcaloïdes par notre système de culture (y a t il un manque à gagner dans le procédé ? Combien ?).

L'incubation est réalisée sur une durée de 72h, et des prélèvements sont effectués à 0, 5, 7, 24, 48 et 72h pour analyse par HPLC. On peut ainsi établir les cinétiques de dégradations des alcaloïdes par la microflore, et de ce fait, suivre l'évolution de la demi-vie des alcaloïdes en fonction du temps de culture.

Afin d'être sûr que la dégradation observée est bien due à une dégradation biologique et non à des facteurs physico-chimiques, un témoin est réalisé. Trois échantillons du milieu en cours de culture sont stérilisés (autoclavés), 12,5mg/L de H&S sont ajoutés et ces témoins sont ensuite traités de la même façon que les échantillons. Ces contrôles gardent leur concentration constante au cours du temps. La dégradation observée est donc bien due à la microflore, et vraisemblablement aussi à l'activité d'enzymes, issues de la plante ou de microorganismes présentes dans la solution nutritive.

Dans tous les cas, on observe une perte d'alcaloïdes par dégradation due aux microorganismes présents dans la solution nutritive: 6 mg/L.jour pour l'hyoscyamine, 5 mg/L.jour pour la scopolamine, pour les modalités A, B et C respectivement ; ainsi que, 5 et 4 mg/L.jour pour l'hyoscyamine et la scopolamine, avec la modalité D. Ce meilleur résultat obtenu avec D conforte l'intérêt de travailler en condition serfroidisolchau. D'après les résultats

obtenus au cours de l'expérience, pour chaque modalité, l'hyoscyamine apparaît être plus vite dégradée que la scopolamine (figure 32).

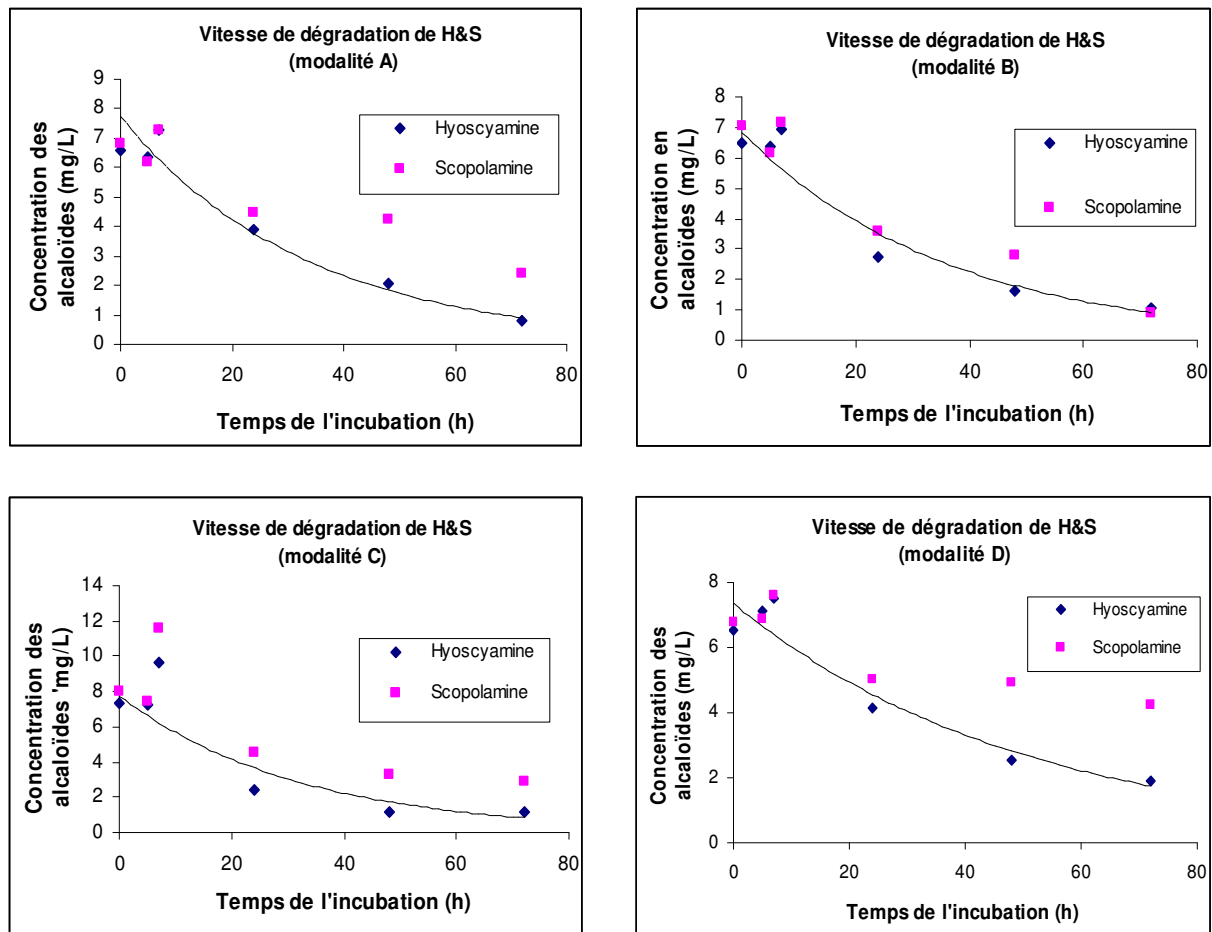
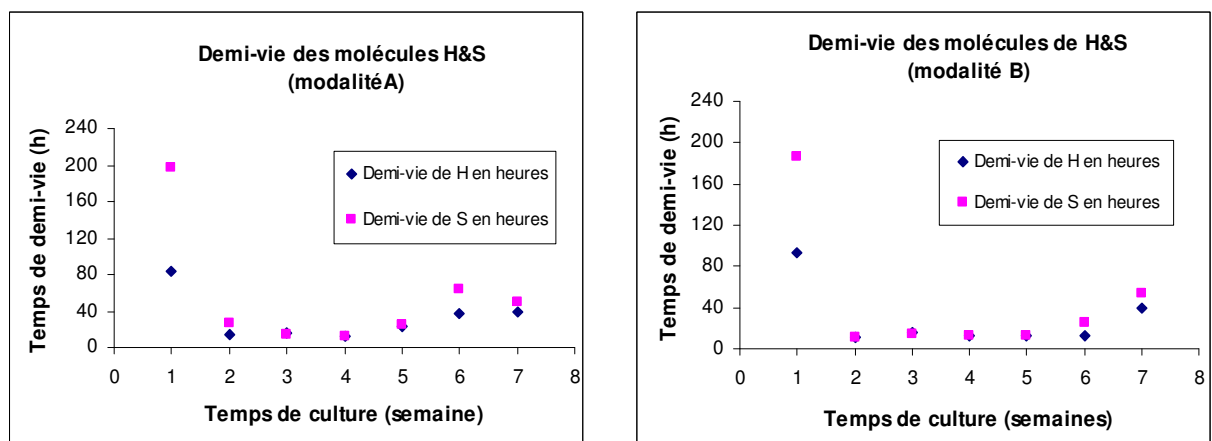


Figure 32: Vitesses moyennes de dégradation des alcaloïdes tropaniques, H&S, par la microflore dans les milieux de culture. Courbes établies ici sur la base de valeurs moyennes intégrant tous les prélèvements effectués au cours de la culture hydroponique.



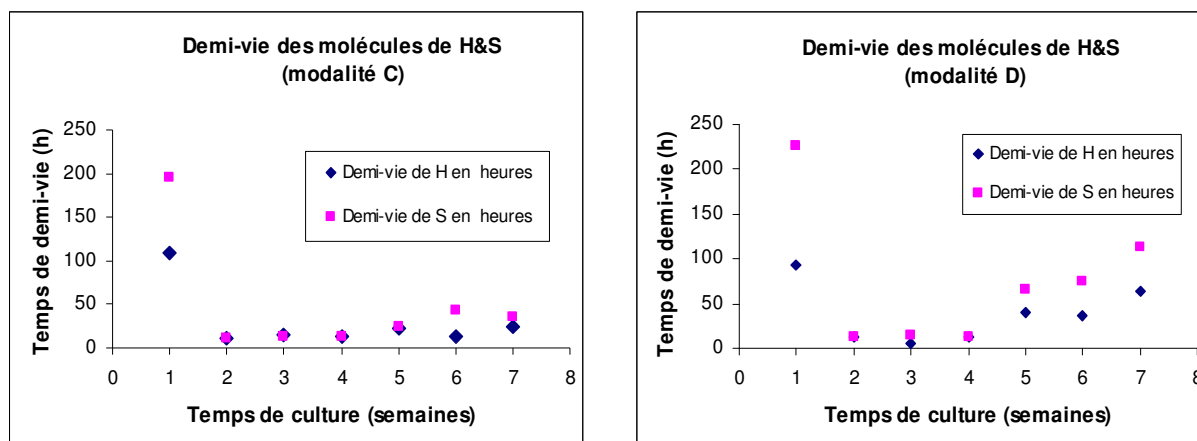


Figure 33: Evolution de la demi-vie de H&S en fonction du temps de culture des plantes en hydroponie. Ces courbes sont établies à partir des valeurs de demi-vie déterminées graphiquement sur chaque cinétique établie à chaque semaine de culture des plantes.

Pour toutes les modalités, à la première semaine de culture des plantes, la demi-vie de H&S présente une valeur importante (en moyenne 100h pour l'hyoscyamine et 200h pour la scopolamine), ce qui traduit une faible dégradation des alcaloïdes tropaniques par les microorganismes (figure 33). En effet, le début de culture correspond à la mise en place de la microflore. Par contre, à partir de la 2^{ème} semaine, la valeur de demi-vie diminue progressivement, avec une moyenne de 20h à la 3^{ème} semaine, et reste stable jusqu'à la 6^{ème} semaine. Au bout de 7 semaines de culture, le temps de demi-vie réaugmente. Cette variation de la dégradation des alcaloïdes au cours du temps de culture correspond à des changements dans les populations microbiennes, comme nous l'avons observé précédemment:

Pour les modalités A et B, le temps de demi-vie diminue à partir de la 2^{ème} semaine, moment où la microflore à croissance lente commence à se développer. De même, pour la modalité C, il diminue après la 3^{ème} semaine de culture, et semble correspondre aussi au moment où la microflore à croissance lente se met en place. Par contre, pour la modalité D, la relation entre cette diminution et la formation d'une microflore à croissance lente est difficile à établir. Pour les trois dernières semaines (5 à 7), le temps de demi-vie des molécules chez D est plus élevé par rapport aux autres. Cette différence pourrait s'expliquer par une population microbienne moindre pour cette modalité. Une température constante de la solution nutritive en serre froide semble donc être plus favorable, avec une dégradation moindre des alcaloïdes due à une microflore moins importante.

III-4.7 Discussions et conclusion partielle

L'objectif principal de cette étude a été de déterminer les conditions de culture les plus favorables pour favoriser la production de métabolites secondaires des *Datura innoxia* cultivées en hydroponie.

Parmi les conditions de cultures testées, les modalités A, B (installées en serre chauffée) et D (serfroisolchau) permettent un développement de la biomasse plus important. Par contre, l'apport de la lumière artificielle (serchau) ne semble pas avoir d'effet significatif sur une augmentation de la biomasse totale. Le chauffage de la serre et l'éclairage des plantes engendrent une dépense énergétique supplémentaire et un surcoût non négligeable pour la production d'alcaloïdes, avec un grain de rendement pas très important. L'étude de la biomasse à l'aide des logiciels WinFOLIA et WinRHIZO a permis de mettre en évidence un développement plus important des parties aériennes et des parties racinaires pour la modalité D. A travers les résultats obtenus, une serre relativement froide, avec la mise en œuvre d'une température relativement constante et une solution nutritive relativement chaude, améliore le développement végétatif de la plante. Pareillement, l'expérience menée sur les teneurs en H&S révèle également que la modalité D est la plus intéressante. Cette modalité semble donc être la solution à privilégier en vue d'une production industrielle de métabolites secondaires en hydroponie, car elle nécessite un investissement moins important que le chauffage de la serre.

L'expérience relative au traitement lumineux suggère de nombreuses remarques. Une légère augmentation de la teneur en H&S chez plantes de modalité B a été constatée pour l'intensification d'éclairage par rapport au « témoin » (modalité A) situé dans les mêmes conditions de température élevée (serchau). Dans ce cas où l'ensemble des plantes est cultivé à une température élevée (modalités A&B), nous avons vu que la lumière supplémentaire stimulait le développement de la plante, en particulier de tiges feuillées et l'accumulation de la scopolamine, en comparaison avec les plantes cultivées sous une faible température (modalité C). L'effet favorable de ce traitement nous conduit donc à penser que la température ambiante intervient de manière importante sur le métabolisme de ces molécules (*i.e.* biotransformation de l'hyoscyamine en scopolamine).

Avec le procédé "Plantes à Traire", notre but est de produire des métabolites à partir de plantes en qualité et quantité importante, tout en étant économiquement rentable. Un des problèmes posés par cette technique, est la dégradation de H&S sécrétées par les racines de plantes par la microflore se développant dans la solution nutritive. En effet, au bout d'environ

deux semaines de culture, une microflore s'est installée dans du milieu nutritif. L'activité de cette microflore engendre des effets indésirables quant à la production de métabolites secondaires pour le procédé de production « PAT ». Les microorganismes sont responsables d'une perte partielle de la production d'alcaloïdes tropaniques. En vue d'une application industrielle, la maîtrise de la microflore présente dans la solution nutritive joue un rôle important. Il s'agira de récupérer un maximum de molécules libérées par les racines dans le milieu de culture, en limitant la dégradation par la microflore. Pour palier à ce problème de dégradation, les molécules pourraient être récupérées en continu par un dispositif de piégeage conventionnel pour optimiser le rendement.

De la même manière, afin d'optimiser la production de métabolites par des plantes cultivées en conditions hydroponiques, l'établissement d'une microflore qui ne dégrade pas, ou peu, ces molécules peut être nécessaire. Afin d'étudier plus précisément les mécanismes mis en jeu dans la dégradation, puis, pour gérer au mieux la microflore, il conviendrait d'identifier précisément les microorganismes de la microflore s'installant naturellement. Ils pourraient être identifiés par différentes techniques: Galerie biochimique API, PCR avec des amorces spécifiques.

Effets de "l'environnement chimique" sur la croissance et la production de métabolites secondaires

Les conditions de culture qui affectent la performance des racines de plantes en cultures hydroponiques (Samia, 1992 ; Morard, 1995) ont été largement étudiées au cours des dernières décennies. Chaque espèce de plante rapportée dans la littérature nécessite l'optimisation de ses conditions de culture. Le type de milieu, le pH du milieu, les compositions des macroéléments et des oligoéléments ont été étudiés pour obtenir les meilleures performances de croissances et d'améliorations de la production de métabolites (Bourgau, 1990 ; Tran, 2005 ; Demeyer et Dejaegere, 1997). Dans la continuité de cette exploration, nous cherchons à caractériser chez *Datura innoxia*, l'effet des pH de la variation du pH de la solution nutritive sur la croissance et la production de H&S dans la plante. L'interaction entre la nutrition azotée, l'accumulation et la distribution de l'azote/carbone, et la biosynthèse et l'accumulation des alcaloïdes dans la plante seront également abordées.

III-5. Effet du pH des milieux de culture

Le pH traduit une balance ionique de la solution nutritive. Sa valeur initiale est une conséquence de la constitution du milieu de culture. Ses fluctuations sont le reflet des échanges d'éléments entre les racines et le milieu. Le contrôle du pH de la solution ainsi que son électroconductivité permettent de gérer le milieu quant aux besoins de chaque plante et à chaque stade de sa vie. Ainsi, la plante est stimulée (maximum de son potentiel génétique), et elle produira de plus grosses fleurs, de plus gros fruits. Dans le cas de plantes médicinales, celles-ci pourraient voir une forte augmentation de leur production et de leur concentration en principe actif (Subroto *et al.*, 1996).

Pour tester l'effet pH, nous avons utilisé 12 bacs de culture en PVC. Chacun contient 25L de solution nutritive et 18 plantes. La configuration retenue est de 6 traitements de pH (3 ; 4 ; 5 ; 5,8 ; 6 et 7) disposés au hasard dans la serre avec deux répétitions par modalité. Durant la culture, le pH des solutions a été mesuré 2 fois par semaine. Il a été ramené à sa valeur initiale par addition de H₂SO₄ 0,01N. Le niveau d'eau a été lui aussi maintenu constant. Les quantités d'acide à apporter ont été calculées d'après la titration au laboratoire d'un litre de solution prélevé dans chaque bac. Le sulfate est utilisé ici (correction du pH des milieux) comme anion compensateur des variations de nitrate, car il est couramment admis que les

plantes restent insensibles à de fortes variations de SO_4^{2-} en solution. L'avantage de ce choix est de maintenir les équilibres cationiques entre les solutions (Vu, 2003).

Parallèlement à la mesure et l'ajustement du pH tout au long de l'expérience, nous avons relevé la conductivité du milieu. Ces valeurs augmentent progressivement quel que soit le pH. Elle atteint une valeur moyenne de 13-14 ms/cm dans les solutions à pH4 ; 5 ; 5,8 ; 6 et 7, et sa valeur minimale, et la plus faible, est de 9 ms/cm au pH3 (figure 34a). Nous avons observé une corrélation entre le pH et la conductivité de la solution nutritive au cours du temps.

III-5.1 Croissance végétative

Avant et après la mise en place de la culture, toutes les plantes de la modalité pH3 montrent des signes de flétrissement. La décoloration des tiges est observée, et certaines de leurs feuilles flétries tombent quelques jours plus tard. Les racines deviennent brunâtres, puis se nécrosent. Ce phénomène a été observé pendant les 5 premiers jours. Au bout d'environ une semaine, ces plantes reprennent leur croissance et émettent d'abondantes racines secondaires. Après 2 semaines de culture, leurs racines ont rattrapé la longueur des autres modalités avec une valeur moyenne de 30cm de longueur (figure 34b).

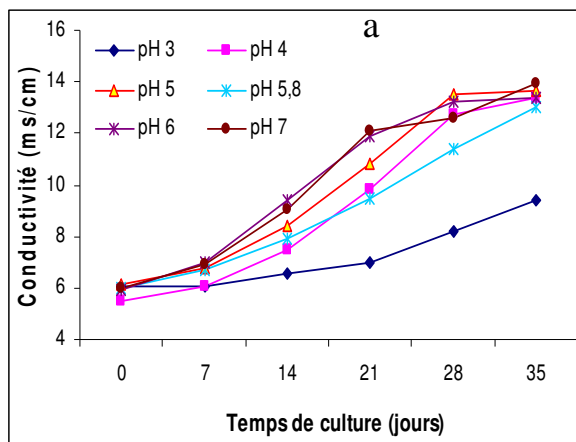


Figure 34a: Effet du pH sur l'évolution de la conductivité de la solution nutritive au cours du temps de culture de daturas hydroponiques.

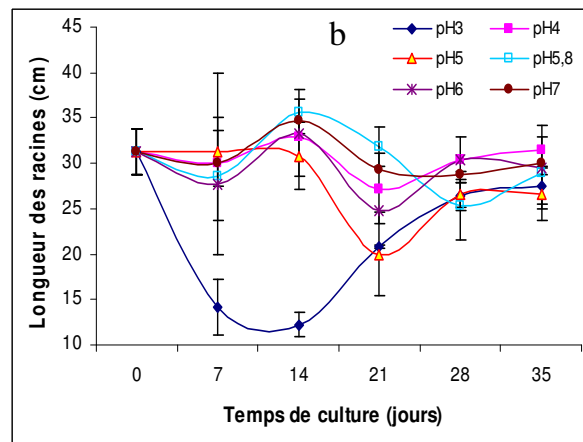


Figure 34b: Effet du pH sur la longueur maximale des racines au cours du temps de culture de daturas hydroponiques.

La hauteur des plantes des modalités pH4 ; 5 ; 5,8 ; 6 et 7 augmente progressivement au cours du temps, contrairement aux plantes de la modalité pH3 qui ont gardé toujours la même taille. Après 3 semaines de culture les plantes des autres modalités sont trois fois plus grandes que celle des plantes de modalité pH3. A 21^{ème} jour, les plantes de cette modalité commencent

à se développer progressivement jusqu'à la fin de l'expérience. Les "plantes-pH3" sont celles qui présentent la croissance en hauteur la plus faible (30cm, contre 80cm) (figure 35a).

A l'exception des plantes cultivées dans le milieu à pH3, le nombre de feuilles s'accroît rapidement quel que soit le pH considéré. La différence entre pH3 et les autres pH est significative dès 3 semaines et, au bout de 35 jours de culture, le plus faible gain en termes de feuilles formées est observé chez les plantes au pH3 (25 feuilles contre 40) (figure 35b).

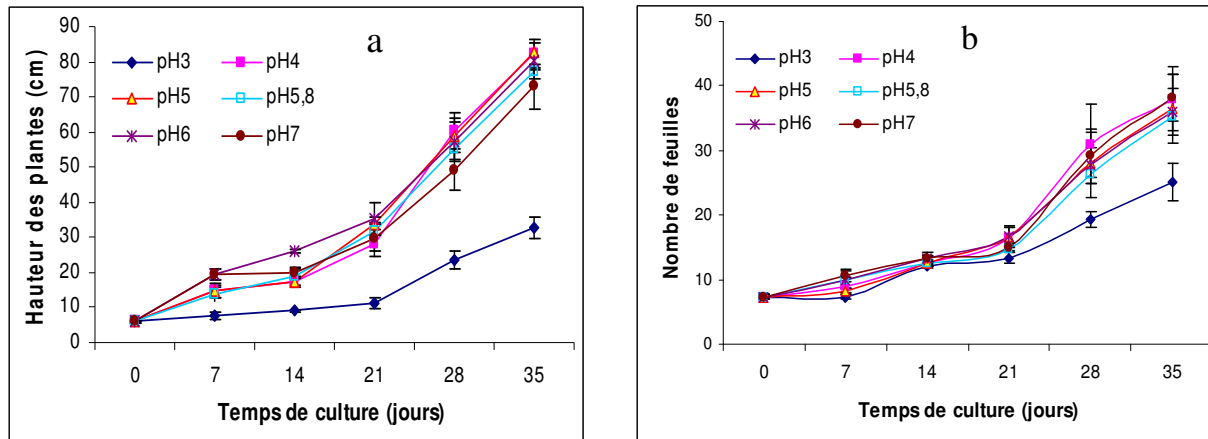


Figure 35 : Evolution de la hauteur des plantes et de leur nombre de feuilles en fonction du pH de la solution nutritive.

III-5.2 Etude de la production de biomasse et des rendements

La biomasse des plantes cultivées sur solution nutritive à différents pH suit la même tendance que les paramètres de croissance (figures 35a-b). Pour toutes les modalités, elle augmente faiblement pendant les premiers 21 jours. Au delà, et jusqu'au 35^{ème} jour, on constate une forte augmentation de la biomasse quel que soit le pH (entre 4 et 7). En moyenne, la biomasse fraîche des plantes des modalités pH4 ; 5 ; 5,8 ; 6 et 7 passe de 30 à 35kg de biomasse fraîche/m² (figure 35a), alors que celle des plantes de modalité pH3 n'est que de 15 kg/m².

Hormis, le pH très acide (pH3) qui pénalise fortement les plantes, les autres modalités n'ont pas d'incidence notable sur le développement de datura.

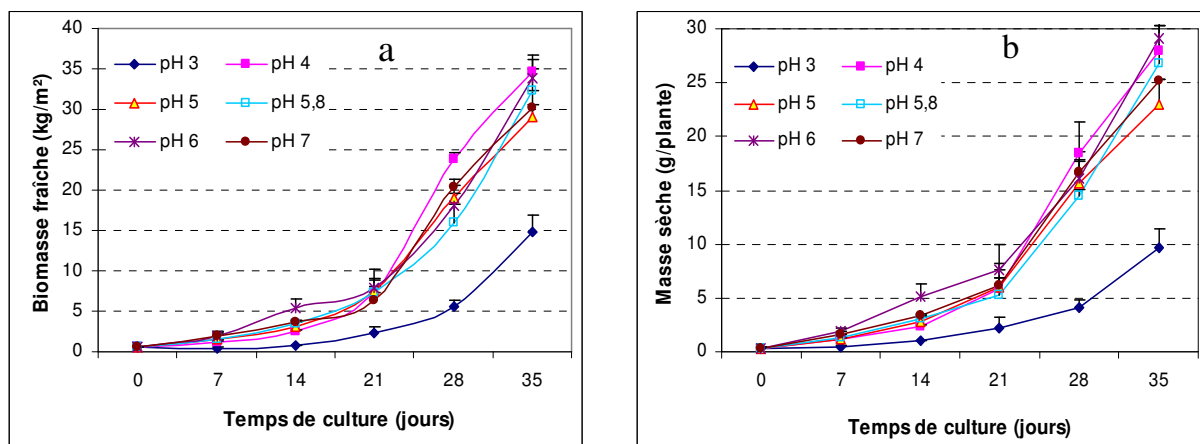


Figure 36: Evolution de la biomasse des plantes : MF (a) et MS (b) en fonction du pH de la solution nutritive.

III-5.3 Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques

La teneur en hyoscyamine et en scopolamine dans la plante varie en fonction du pH et du temps (figures 36). La teneur en hyoscyamine, sa teneur tend à diminuer, passant de 0,04%MS dans les plantes au premier jour (t0) à 0,02%MS, en moyenne, au bout de 5 semaines de culture pour les modalités pH4 ; 5 ; 5,8 ; 6 et 7. Pour les plantes de modalité pH3, la teneur en hyoscyamine diminue au cours des 2 premières semaines, puis augmente fortement pour passer de 0,02%MS à 0,1%MS lors de 3^{ème} semaine, et redescend à 0,048%MS à la 5^{ème} semaine (figure 36a). A la fin de la culture, la teneur en hyoscyamine des plantes cultivées du milieu à pH3 est 2,5 fois plus importante que celle des pH4 ; 5 ; 5,8 ; 6 et 7.

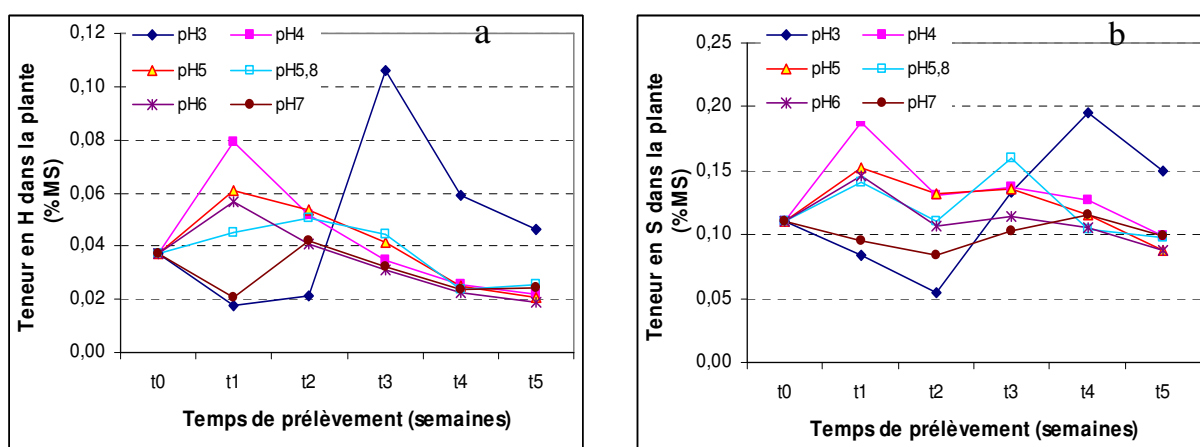


Figure 36: Evolution de la teneur en H (a) et S (b) dans la plante en fonction du pH de la solution nutritive.

La teneur en scopolamine, reste sensiblement voisine de 0,1%MS pour les plantes des modalités pH4 ; 5 ; 5,8 ; 6 et 7, alors que celle des plantes à pH3, est de 0,15%MS soit 1,5 fois plus (figure 36b). Cette différence est statistiquement significative.

Par contre, l'accumulation de matière sèche pour ces plantes "pH3" est moins importante que celle des autres (figure 37a). La productivité après 5 semaines n'est donc que de 10,9mg H&S/m² pour les plantes à pH3 contre 19mg H&S/m² pour les autres plantes (figure 37b).

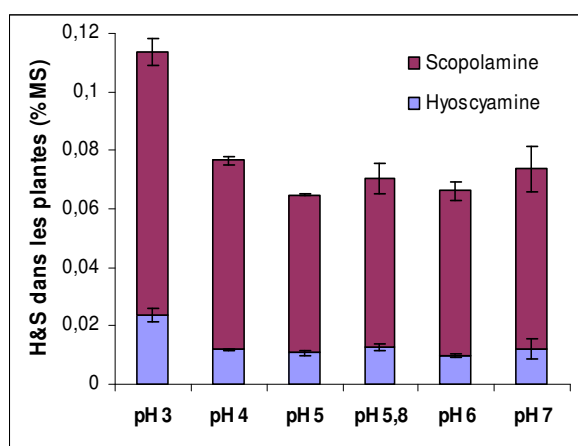


Figure 37a: Effet du pH des milieux sur la teneur en H&S dans la plante au bout de 5 semaines de culture.

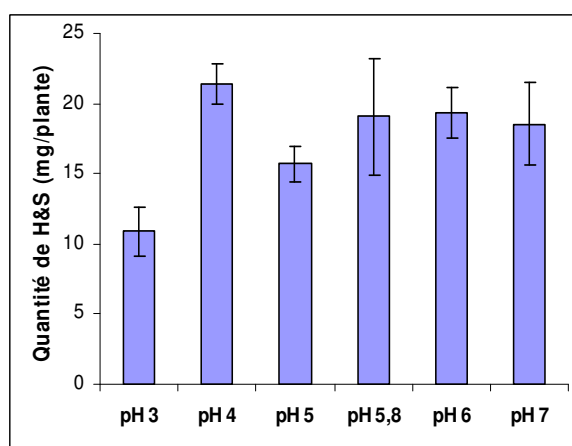


Figure 37b : Effet du pH des milieux sur la productivité de H&S dans la plante au bout de 5 semaines de culture.

D'après ces résultats, le fait de modifier le pH du milieu dans une gamme allant de 4 à 7 ne favorise pas la croissance et ni le contenu en H&S des plantes. Par contre, à pH 3, au bout d'une semaine, un effet négatif est visible et conduit à une réduction de la vitesse de croissance. Nous pouvons en conclure que *Datura innoxia* peut tolérer un "spectre" de pH du milieu assez large, la modification de ce facteur n'a pas d'effet majeur sur la production globale d'alcaloïdes tropaniques dans notre condition.

III-6. Effet de la disponibilité en azote du milieu sur la croissance, la biosynthèse et l'accumulation des alcaloïdes tropaniques

L'alimentation minérale est un des facteurs qui conditionnent la croissance et le développement des végétaux (Morard, 1995 ; Le Bot *et al.*, 1997). Dans l'espoir d'augmenter la production de métabolites chez *Datura innoxia*, nous avons donc cherché à évaluer l'impact potentiel de la concentration en nitrate du milieu nutritif.

L'azote minéral absorbé par les racines est assimilé pour satisfaire les besoins des plantes en composés aminés nécessaires à la croissance. Divers auteurs ont mis en évidence l'existence d'une relation d'allométrie liant les dynamiques de croissance en matière sèche et l'absorption d'azote par le peuplement (Caloin *et al.*, 1984 ; Greenwood *et al.*, 1986 ; Justes *et al.*, 1994). Ainsi, il existe à tout moment du développement des cultures, une fourniture minimale d'azote qui permet la production maximale de biomasse. En dessous de cette offre, l'azote est le facteur limitant de la croissance. En cas d'offre excessive, l'azote s'accumule dans la plante sans permettre une accumulation accrue de biomasse (Justes *et al.*, 1994). Ces notions sont à l'origine de la définition d'une concentration en azote critique prise, à tout moment du cycle de croissance, permettant la vitesse de croissance maximale en matière sèche (Lemaire *et al.*, 1997a-b).

Par ailleurs, l'azote présent dans le noyau tropane, à partir duquel se forme l'hyoscyamine et la scopolamine, participe à la régulation du flux de métabolites primaires vers les métabolites secondaires (Fliniaux *et al.* 2001). Aussi, Bourgaud (1990) et Demeyer et Dejaegere (1997) ont montré qu'il y avait incidence du métabolisme primaire, celui de l'azote, sur la régulation du métabolisme secondaire. Le statut azoté engendre ainsi des changements majeurs dans le métabolisme secondaire de la plante (Bryant *et al.*, 1993 ; Fajer *et al.*, 1992 ; Van Der Werf *et al.*, 1993 ; Hakulinen, 1998 ; Cipollini *et al.*, 2002 ; Lou and Baldwin, 2004 ; Fritz *et al.*, 2006).

Dans notre cas, l'objectif concerne la production des alcaloïdes tropaniques par l'obtention d'un maximum de biomasse à teneur élevée par unité de surface. Il est probable que l'azote joue un rôle majeur et, pour cela, il sera nécessaire de modéliser le couplage entre demande en azote par *Datura innoxia* en hydroponie et, développement d'une biomasse à racines riches en alcaloïdes tropaniques.

III-6.1 Description de l'expérience

L'expérience est conduite en serre et est constituée de 8 bacs de culture indépendante. Chacun contient 18 plantes pour 30L de solution nutritive dont la concentration en nitrate est arbitrairement fixée à 0,125 ; 0,2 ; 0,3 ; 3 ; 7 ; 15 et 39,4 mM et 39,4* mM NO₃⁻ (milieu MS maintenu, tout au long de la culture, utilisé comme référence) (annexe 4). Chacune de ces concentrations constitue une modalité. Le dispositif est censé regrouper des traitements où la concentration en azote est limitée, et d'autres où elle est non limitée pour la croissance des plantes. Le choix de ces concentrations repose sur des études préalables réalisés sur la tomate

et le choysum (un légume vert asiatique du genre de *Brassica*) (Vu, 2003). Pour la tomate, chez qui les solutions à 0,05-0,3 mM NO_3^- se sont avérées limitantes pour la croissance, mais pas les autres (3-15 mM). Et pour le choysum peut être cultivé sans limitation de croissance dans des conditions de disponibilité en azote très faibles. Par rapport à la pratique des professionnels du hors sol sous serre, une solution à 15 mM NO_3^- est représentative des solutions utilisées pour les culture légumière (Letard *et al.*, 1995).

Les solutions nutritives utilisées ici ne comportent que du nitrate (NO_3^-) comme source d'azote. Ce sont des solutions complètes, équilibrées à la fois du point de vue des macro- et des oligoéléments (annexe). Elles sont préparées avec de l'eau déminéralisée. En vue de maintenir constantes les concentrations en nitrate des solutions nutritives on procède à un renouvellement des milieux une fois par semaine, à l'exception de la solution de la modalité 39,4 (MS)* (référence), dont la solution n'esp pas renouveler, mis à part le réajustement du niveau d'eau au cours du temps.

Durant la culture, le pH des solutions a été mesuré 2 fois par semaine et en cas de dérive, il a été ramené à une valeur proche de 5,0 (4,9-5,1), par addition manuelle de H_2SO_4 0,01N comme décrit dans l'expérience précédente.

III-6.2 Influence de l'apport azoté sur la croissance de la plante

Nous avons réalisé des mesures biométriques à un rythme bihebdomadaire et/ou hebdomadaire afin de comparer les croissances d'un traitement à l'autre. Nous avons également noté, pour chaque espèce et chaque traitement, l'apparition des boutons floraux et le début de la floraison. Les observations se sont déroulées sur une période de 45 jours. Nous présentons d'abord les résultats relatifs à la croissance végétative puis ceux concernant les rendements de la production de biomasse.

III-6.2.1 Hauteur des plantes

Les plantes atteignent une hauteur moyenne de 8 cm pour toutes les modalités au 21^{ème} jour de végétation (figure 38). A partir de 31 jours, leur développement se repartir en trois groupes nutritionnels : les plus pauvres de 0,125 ; 0,200 et 0,300mM (N-); les plus riches : 15, 39,4 et 39,4*mM (N+) et un groupe intermédiaire : 3 et 7mM (Ni). Les plantes du groupe N- présentent la croissance en hauteur la plus faible, soit 8 cm, alors que les plantes du groupe N+ dépassent 20 cm. Les plantes du groupe Ni atteignent environ 13-15 cm de hauteur. Cette

tendance se renforce au dernier prélèvement. A cette date, nous avons obtenu quatre groupes de plantes : le premier, avec des plantes environ 40 cm (15 et 39,4*mM), le second avec 30 cm (7 et 39,4mM), ensuite le troisième avec 20 cm (3mM) de hauteur, et enfin le plus faible n'atteignent que 9 cm (0,125 ; 0,200 et 0,300mM).

Dès le 31^{ème} jour, on constate un effet significatif, sur la croissance en hauteur des plantes. Cet effet est statistiquement significatif et se maintient jusqu'au 45^{ème} jour de culture.

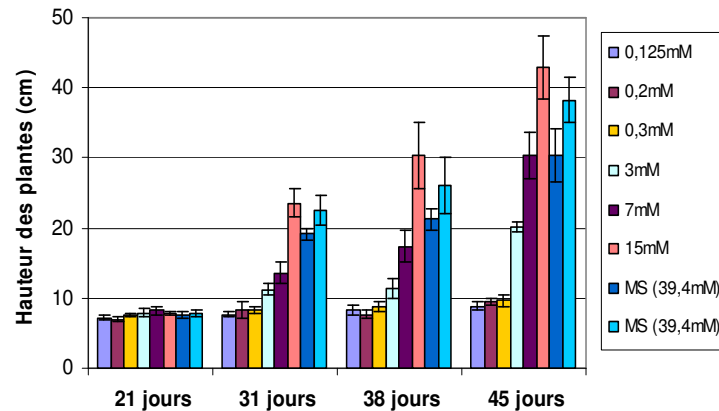


Figure 38: Evolution de la hauteur des plantes en fonction de la concentration en nitrate du milieu nutritif.

III-6.2.2 Nombre total de feuilles

Le nombre total de feuilles évolue de manière linéaire avec le temps ou la somme des températures de l'air, pour atteindre en moyenne 8-9 feuilles par plante, au 21^{ème} jour de culture, pour toutes les modalités.

A partir du 31^{ème} jour, le nombre de feuilles de toutes les plantes du groupe N+ et Ni est plus important que celui des plantes du groupe N-. A 45^{ème}, nous obtenons quatre groupes de significativement distincts : le premier présente environ 40 feuilles (15 et 39,4*mM), le second de 24 (3, 7 et 39,4mM), le troisième de 20, et enfin le dernier, le plus faible, de 9 feuilles (0,125 ; 0,200 et 0,300mM de NO₃⁻) (figure 39).

L'influence du traitement azoté est significative à partir du deuxième prélèvement. Le traitement de 15mM permet d'obtenir nombre de feuilles le plus important, soit 6 fois plus que le groupe « pauvre ». Les plantes plus « riches » en azote sont capables de développer un appareil photosynthétique beaucoup plus important que celles des modalités plus « pauvres ».

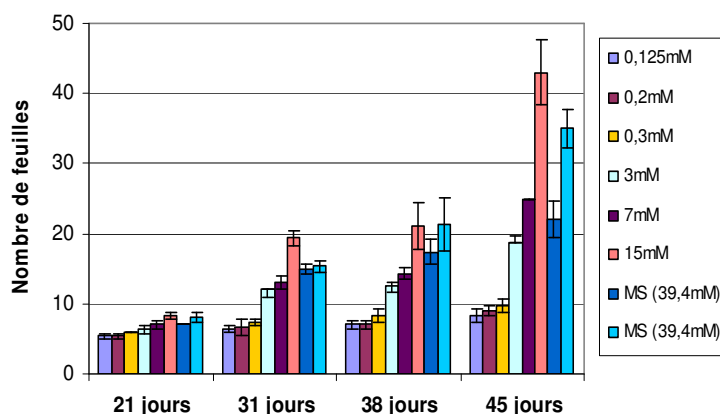


Figure 39: Evolution du nombre de feuilles en fonction de la concentration en nitrate du milieu nutritif.

III-6.2.3 Surface foliaire

La surface foliaire développée par la culture augmente fortement en fonction de la disponibilité en azote, pendant les premiers 21 jours. Au dernier prélèvement (45 jours), les variantes « riches » en azote conduisent à une surface foliaire importante de 1000-1200cm²/plante pour les modalités 7, 15, 39,4 et 39,4*mM et 600cm²/plante pour la modalité 3mM. Alors que les milieux « pauvres », soit les modalités 0,125 ; 0,200 et 0,300mM de NO₃⁻, n'ont qu'une surface foliaire de 40cm²/plante en moyenne (figure 40).

Pour les plantes fortement enrichies en azote (N+), la surface foliaire est :

- ✓ trente fois plus importante que chez les plantes carencées, et
- ✓ quinze fois plus importante que celles des plantes « intermédiaire » (Ni).

Nous pouvons conclure à effet statistiquement significatif de la disponibilité en nitrate sur la surface foliaire.

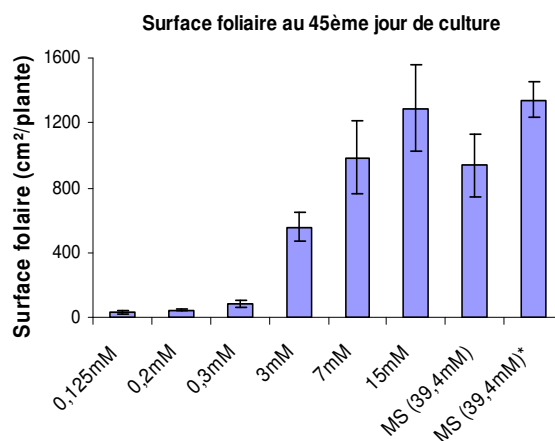
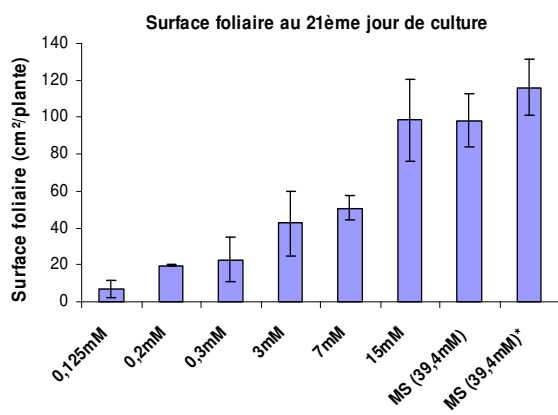


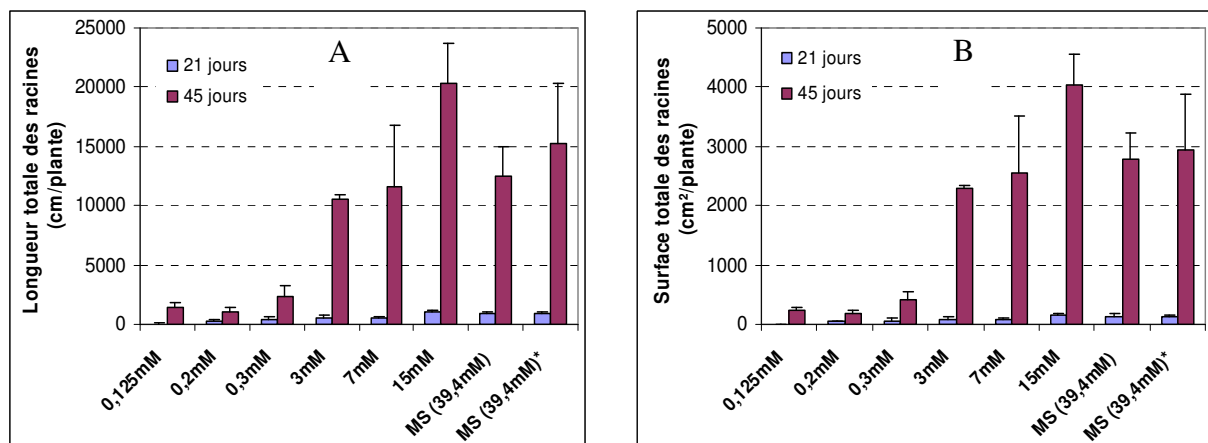
Figure 40: Surface foliaire des plantes (cm²/plante) à 21 et 45 jours de culture en fonction de la concentration en nitrate du milieu nutritif.

III-6.2.4 Morphologie racinaire

Au niveau des racines, au 21^{ème} jour de culture, les paramètres de croissance (longueur, surface, diamètre, volume, nombre d'apex et ramification des racines), ne sont pas beaucoup de différents entre les traitements. L'effet de l'apport d'azote pour le développement des racines n'apparaît pas clairement. Au 45^{ème} jour, on note une augmentation de tous les paramètres racinaires en fonction des apports azotés (planche 24 et figure 41). Les variables relatives à la morphologie du système racinaire sont toutes corrélées significativement à la forte d'azote. Dans le groupe riche en azote, les plantes de la modalité 15mM de NO₃ se détachent totalement des autres. Le facteur disponibilité en azote exerce un effet significatif sur tous les paramètres de croissance racinaire.



Planche 24: Racines de plantes cultivées depuis 45 jours avec différentes concentrations en nitrate.



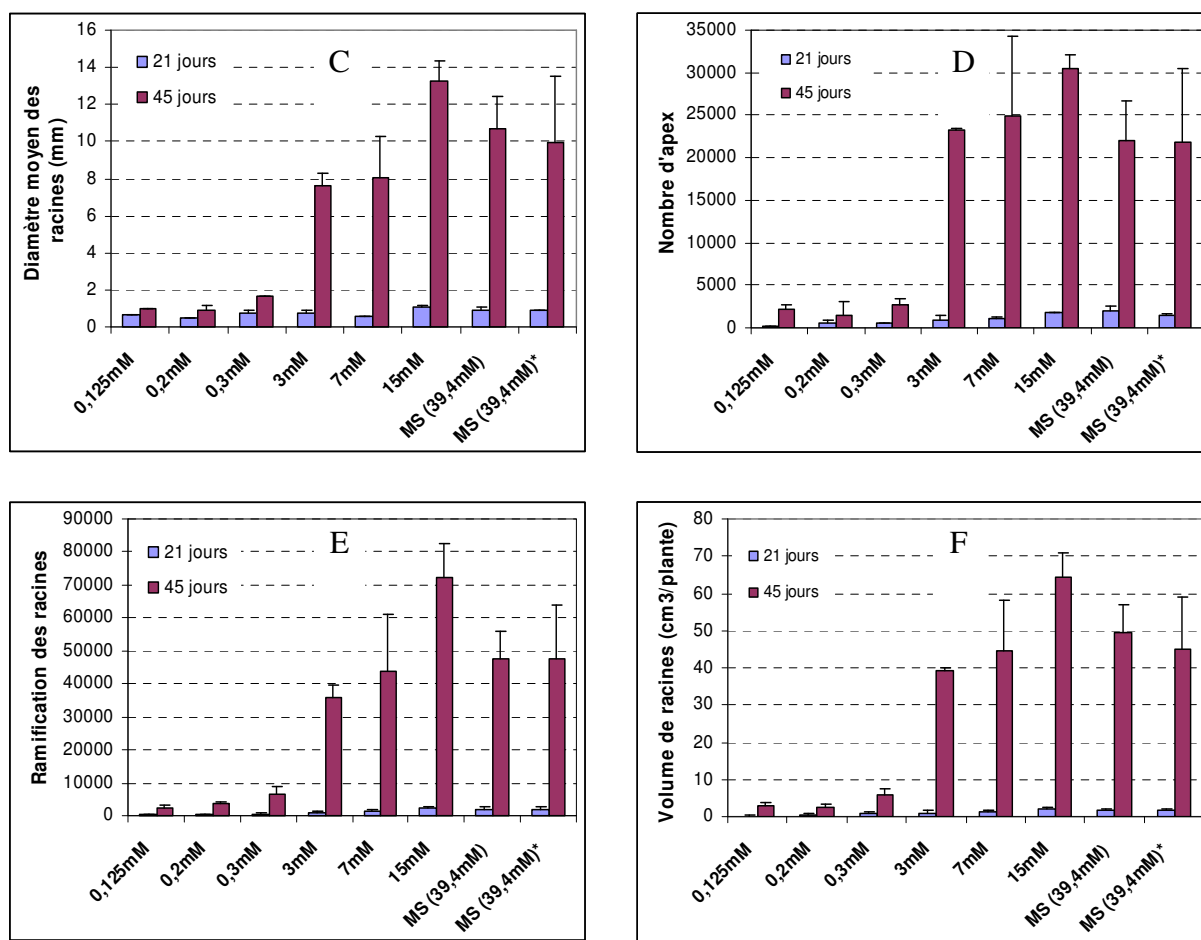


Figure 41: Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramifications (E) et volume total (F) des racines de plantes cultivées depuis 21 et 45 jours en bac hydroponique sous différentes concentration en nitrate du milieu nutritif.

III-6.2.5 Production de biomasse

Pour toutes les modalités, la biomasse fraîche des plantes augmente faiblement pendant les premiers 30 jours. Ensuite, on observe une forte augmentation pour les plantes N+. Les meilleurs rendements de 17kg de matière fraîche/m² sont obtenus avec les plantes recevant 15 et 39,4*mM NO₃⁻ ; pour les plantes avec 7 et 39,4mM NO₃⁻, elle est de 12kg/m² ; ensuite on note 8kg/m² pour les plantes à 3mM NO₃⁻, et, enfin, pour les plantes carencées 2kg/m² au 45^{ème} jour (figure 42a).

Aussi, la matière sèche des plantes confirme les résultats. A la dernière date de récolte (45jours), on enregistre 20g de matière sèche pour la modalité 15mM NO₃⁻, 12g pour 39,4*mM NO₃⁻, et puis 5-8g pour les modalités 3, 7 et 39,4mM NO₃⁻; pour les plantes des modalités 0,125 ; 0,2 et 0,3 mM NO₃⁻, elles ne sont que de 0,6g/plante (figure 42b).

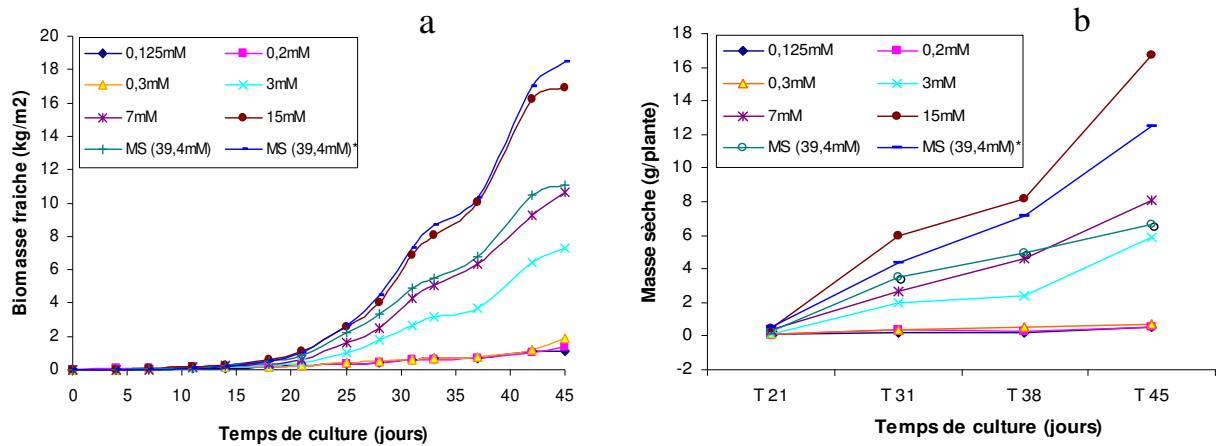


Figure 42: Evolution de la biomasse fraîche (a) et sèche (b) des plantes hydroponiques en fonction de l'apport azoté.

Les biomasses des plantes N+ ont significativement augmenté, soulignant la stimulation de la croissance par l'azote. La matière sèche des parties aériennes est multipliée par un facteur 48, 28 et 16 chez les plantes N+, Ni et référence (MS*), respectivement, par rapport aux plantes N- (figure 43). La masse sèche du système racinaire des plantes N+ dépasse 11-15 fois celle des plantes carencées. La modalité 15mM est la plus « efficace » quant à la croissance de la matière sèche végétale. Il est donc possible de conclure à un effet de l'azote de la solution nutritive sur la croissance des deux parties aériennes et racinaires.

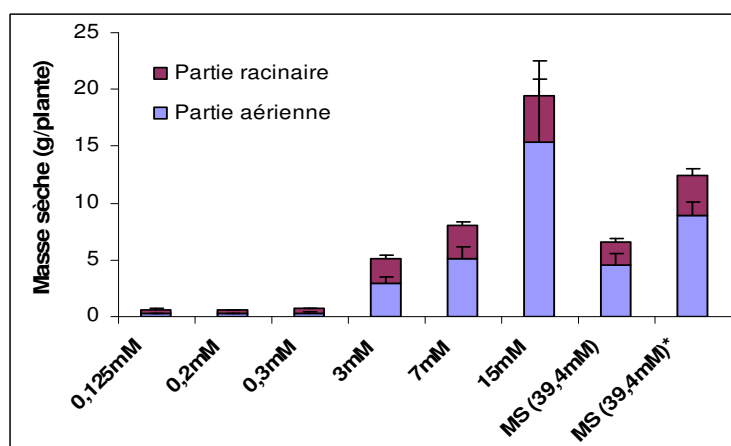


Figure 43: Masse sèche des plantes au bout de 45 jours de culture en fonction de la disponibilité en nitrate du milieu de culture.

Si on examine les paramètres de croissance des parties aériennes et des parties racinaires, on remarque que les plantes N+ atteignent très vite une biomasse plus importante que les plantes N-. Le meilleur résultat est obtenu avec les plantes de la modalité 15mM de NO_3^- . Cependant, les modalités 39,4 et 39,4mM* ont des développements moins importants que la modalité 15mM. Nous pouvons supposer que la disponibilité excédentaire d'azote n'augmente pas la biomasse de la plante.

En complément de la production de biomasse, il est important de préciser la quantité d'alcaloïdes tropaniques présente pour chaque traitement, et de déterminer la relation éventuelle entre la teneur en azote et en carbone accumulés dans la plante et, la teneur en alcaloïdes recherchés en vue de fixer la dose optimale pour la production.

III-6.3 Etude de la quantité d'alcaloïdes produites par plante

La teneur en azote total dans la plante est d'autant plus importante que la quantité de nitrate apportée à été élevée (figure 44). L'effet est plus marqué dans les parties aériennes que dans les parties racinaires où il demeure toutefois clairement visible. De manière inverse, le ratio C/N est d'autant plus faible que la quantité de nitrates disponibles était élevée (figure 45).

Les variations observables entre les différents temps de prélèvement suivent une même logique globale qui doit être liée à la phénologie de la plante, à savoir : les valeurs les plus élevées tendent à correspondre à 31 jours de culture et ensuite, quelles que soient les doses de nitrate apporté aux plantes, les teneur en azote ainsi que le ratio C/N diminuent.

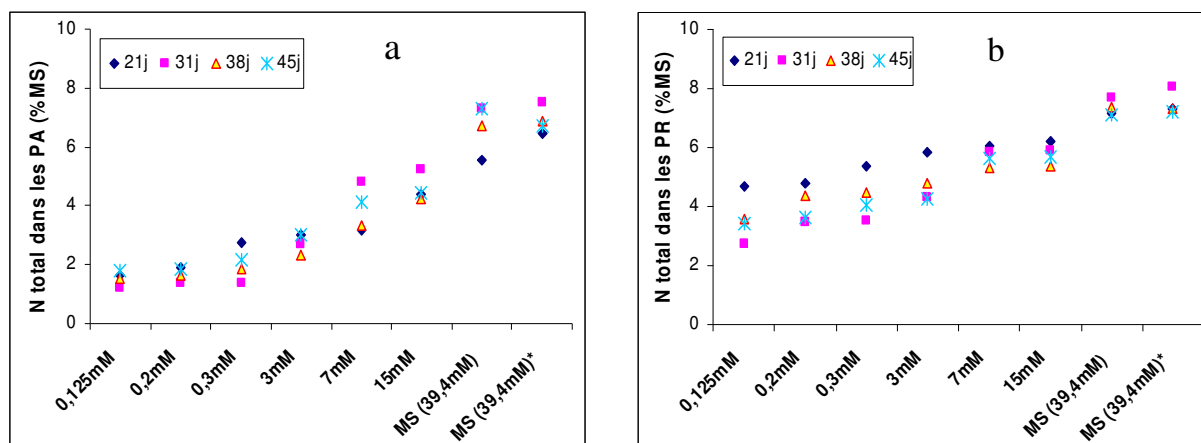


Figure 44: Teneur en azote total dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

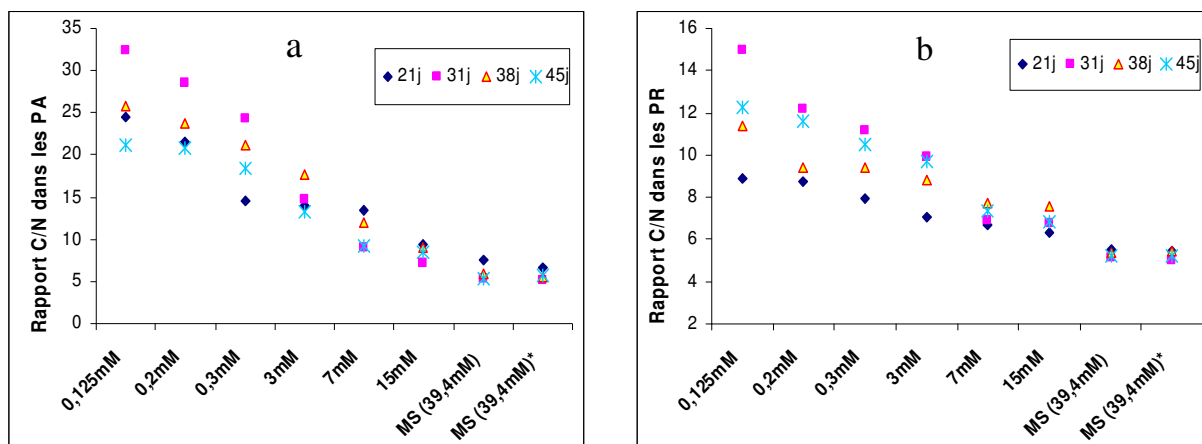


Figure 45: Taux carbone/azote (total) dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

En terme de concentration intra-tissulaire en H&S, les plus faibles apports d'azote ont permis d'obtenir les plus hautes teneurs (figure 46-48a). Ils ont aussi permis d'obtenir les meilleurs ratios biomasse racinaire/biomasse aérienne (tableau 7). Néanmoins, compte-tenu de la plus faible croissance, les plus hautes production et accumulation d'alcaloïdes se retrouvent dans les modalités à relativement haute teneur en nitrate (figure 48). Ainsi, l'optimum expérimental est situé au niveau de la dose de 15mM de NO₃⁻. Près de 20 mg d'alcaloïdes sont alors accumulés dans les plantes.

Cette modalité donne des effets supérieurs à ceux de la modalité de référence, à savoir la culture en solution complète Murashige et Skoog 39,4mM* en apport unique.

L'ensemble des données est récapitulé dans le tableau 7 qui permet également d'établir la relation entre rapport C/N et teneur en alcaloïdes tropaniques (figure 47).

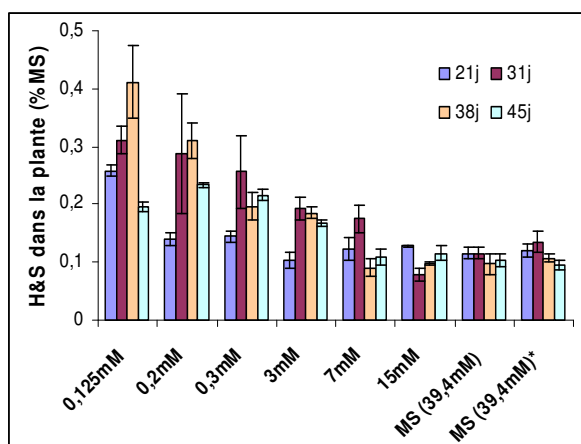


Figure 46: Teneur en H&S dans la plante en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

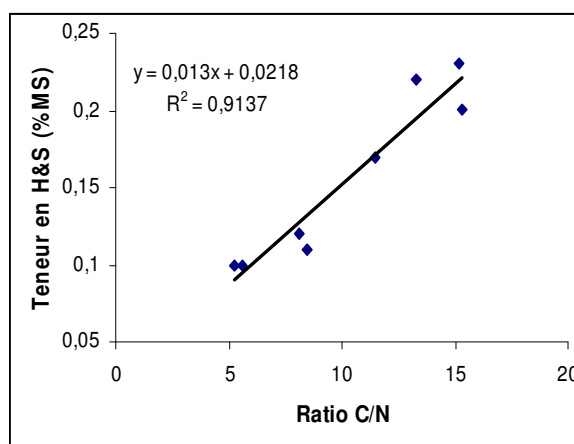


Figure 47 : Corrélation entre le ratio C/N et leur teneur en alcaloïdes de la matière sèche des plantes de 45 jours de culture.

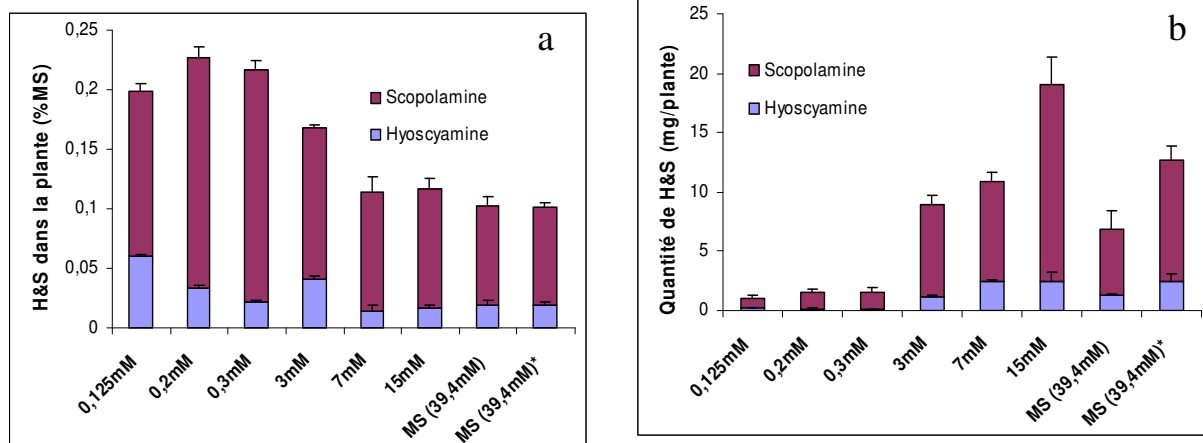


Figure 48: Teneur en H&S des plantes âgées 45 jours (a) et leur production (b) en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet de la disponibilité en NO₃ de la solution nutritive sur la croissance de biomasse, la teneur en N total, rapport C/N teneur en H&S et leur production dans la plante à 45 jours de culture.

Traitement NO ₃ (mmol)	Masse fraîche (kg/m ²)	Masse sèche (g/plante)	Rapport PR/PA	N total (%MS)	Masse N (g/plante)	Rapport C/N	Teneur H&S (%MS)	Quantité H&S (mg/plante)
0,125	1,12	0,56	1,00	2,63	0,015	15,31	0,20 ± 0,01	1,02 ± 0,32
0,2	1,39	0,58	0,97	2,66	0,015	15,17	0,23 ± 0,01	1,59 ± 0,25
0,3	1,88	0,71	0,81	3,08	0,022	13,28	0,22 ± 0,01	1,55 ± 0,40
3	7,32	5,06	0,74	3,56	0,181	11,44	0,17 ± 0,01	8,97 ± 0,90
7	10,65	8,07	0,57	4,68	0,378	8,43	0,11 ± 0,02	10,89 ± 0,91
15	16,92	19,49	0,33	4,70	0,917	8,10	0,12 ± 0,01	19,06 ± 3,03
MS (39)	11,05	6,65	0,47	7,24	0,482	5,25	0,10 ± 0,01	6,87 ± 1,74
MS (39)*	18,45	12,47	0,41	6,87	0,857	5,58	0,10 ± 0,01	12,64 ± 1,85

III-6.4 Discussion et conclusion partielle

L'objectif de ce travail est de piloter au mieux la disponibilité en azote minéral dans le milieu nutritif afin d'optimiser la production de biomasse et de métabolites d'intérêt. La réponse de la plante se traduit par l'augmentation de la croissance des parties aériennes et racinaires sous l'effet de l'apport de nitrate. Une limitation de la croissance aérienne est en particulier induite par une faible disponibilité en nitrate dans la solution nutritive. Les plantes les plus faiblement alimentées ont eu une croissance limitée comme il est classiquement démontré en cas de carence en azote dans le milieu. Les plantes soumises à de faibles disponibilités azotées ($\leq 0,3$ mM) ont permis d'obtenir des teneurs en alcaloïdes plus fortes que celles sous fortes disponibilités (≥ 3 mM). Nous avons trouvé une bonne corrélation ($r^2 = 0,91$) entre le ratio C/N et leur teneur en alcaloïdes de la matière sèche des plantes de 45 jours. Nous avons bien noté la nutrition minérale des plantes est en relation directe avec l'importance du système racinaire et ce résultat est en accord avec celui de Habib (1988).

Une partie de nos résultats est en accord avec ceux de Sreevalli *et al.* (2004). Ces auteurs montrent que la disponibilité de l'azote joue un rôle important dans l'accumulation de matière sèche et la biosynthèse et l'accumulation d'alcaloïdes chez *Catharanthus roseus*. La fertilisation azotée à 150kg/ha augmente le rendement des feuilles et des racines de 170 et 90%, respectivement, en comparaison avec les témoins sans fertilisation azotée. Cet apport induit une augmentation de 87 et 56% du contenu en alcaloïdes dans les feuilles et les racines, respectivement.

Aussi, Fritz *et al.* (2006) rapporte que le profil et le niveau du métabolisme secondaire est régulé en réponse au statut de l'azote dans la plante chez le tabac. La variation de la teneur en nicotine est dépendante de la disponibilité en azote, mais peut être liée aux changements en aval du métabolisme de l'azote. Ces auteurs mettent en évidence qu'une des raisons de ce changement est que l'azote joue sur la régulation de la transcription du métabolisme secondaire chez le tabac. Il ajoute que la carence d'azote mène à des changements majeurs dans le métabolisme secondaire dans le tabac et provoque une augmentation de métabolites secondaires (Bryant *et al.*, 1993 ; Fajer *et al.*, 1992 ; Van Der Werf *et al.*, 1993 ; Hakulinen, 1998 ; Cipollini *et al.*, 2002 ; Lou et Baldwin, 2004 ; Fritz *et al.*, 2006).

Pour la suite des travaux sur *Datura*, on peut imaginer de scinder la conduite des cultures en deux phases :

- ✚ une première phase de production de biomasse sur la base d'une demi-solution de Murashige et Skoog apportée en une seule fois ;
- ✚ une seconde phase de bioproduction d'alcaloïdes au cours de laquelle la carence en azote serait favorisée.

III-7. Conclusion partielle du chapitre I

Nous avons cherché à améliorer les conditions de culture de *Datura innoxia* en jouant sur le milieu afin d'établir le meilleur niveau d'accumulation de biomasse et de métabolites. Ainsi, nous avons pu entrevoir les possibilités de jouer sur la lumière, la température, l'oxygénation de la solution nutritive ainsi que sur le pH et la nutrition azotée. Les pistes qui en ressortent laissent entrevoir des pistes d'amélioration de la conduite des cultures hydroponiques.

Des températures relativement élevées vont dans le sens d'une meilleure croissance mais, à mesure, les teneurs alcaloïdes diminuent. Un manque d'oxygène au niveau racinaire peut être en cause. De la même manière, des faibles apports d'azote induisent une augmentation des contenus en alcaloïdes mais une croissance très limitée. Enfin, un pH "très acide" de 3 a le même effet. Il semble donc bien y avoir opposition entre croissance et bioaccumulation de H&S. Ce qui favorise l'un défavoriserait l'autre.

Nous pouvons donc imaginer de travailler en découplant deux phases :

- une phase de mise en place de biomasse,
- une seconde phase orientée vers la production de composés d'intérêt.

L'étape de croissance pourrait être faite en conditions d'immersion temporaire voire d'aéroponie, avec des apports répétés d'azote de 15mM ou bien avec un seul apport de 39,4mM. En hiver, un complément de lumière pourrait être apporté avant l'aube et après le crépuscule à l'aide de lampes à vapeur de sodium. Le chauffage serait concentré sur les solutions nutritives plutôt que sur l'air de la serre. En été, on chercherait à éviter les pics de température qui risquent de jouer défavorablement sur la disponibilité en oxygène et sur la respiration racinaire.

Pour la phase de production de métabolites, on tenterait alors de stresser les plantes soit par des pH bas, soit par des températures relativement "fraîches" mais, dans tous les cas, en évitant tout apport d'azote.

Globalement, sur la base de nos résultats, on peut espérer ainsi produire plusieurs grammes d'alcaloïdes par mètre carré et par an dans une serre correctement équipée. Un objectif de 10gH&S/m²/an semble parfaitement réalisable en jouant sur l'environnement physique et chimique des *Datura*. Par ailleurs, sans pour autant songer à travailler sur le potentiel génétique des plantes, on peut se demander si il n'existerait pas des possibilités d'amélioration du procédé en jouant sur l'environnement biologique des plantes. C'est ce que nous allons envisager à présent.

CHAPITRE II

Effets de l'environnement biotique sur la croissance des plantes et la production de métabolites secondaires

Introduction

Après avoir démontré que certains facteurs environnementaux avaient des effets positifs sur la croissance ainsi que sur la synthèse des métabolites secondaires, nous avons choisi de travailler sur l'influence de facteurs biotiques.

L'impact d'une microflore se développant naturellement dans la solution nutritive a été mis en évidence. Nous avons approfondi dans cette voie de recherche pour tenter d'optimiser la production d'alcaloïdes. La question générale est de déterminer s'il existe des microorganismes à effet favorable sur la croissance des plantes (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacterias) et sur la biosynthèse des alcaloïdes (microorganismes à effet éliciteur). Pour ce faire, nous avons la possibilité de travailler sur des souches microbiennes bien identifiées et de déterminer lesquelles peuvent avoir un effet positif. A partir de là, les mécanismes d'interaction plantes-microorganismes pouvaient être étudiés précisément.

Notre choix s'est porté sur *A. rhizogenes*, une bactérie du sol, capable de réaliser un transfert d'information génétique dans des cellules végétales et de les faire se différencier en racines autonomes. Ces racines, appelées « hairy root » ou chevelu racinaire, peuvent croître très rapidement sur un milieu sans hormones. En effet, l'infection d'une plante par ces agrobactéries entraîne la formation d'un chevelu racinaire au point de contamination. Les racines issues d'une contamination ont la propriété de pouvoir être cultivées *in vitro* en absence des régulateurs de croissance, à condition bien sûr d'être repiquées régulièrement (Tepfer et Tempé, 1981). De plus, du fait de leur structure organisée, les racines transformées produisent des quantités d'alcaloïdes équivalentes, voire supérieures, à celle de la plante-mère. Ce nouveau matériel présente donc une bonne opportunité pour étudier les voies de biosynthèse des métabolites secondaires produits dans les racines de plantes entières. C'est sur la base de ce raisonnement que nous avons choisi d'orienter notre étude sur l'approche des effets de l'environnement biotique des plantes en hydroponie.

Effets d'*Agrobacterium rhizogenes* sur les cultures hydroponique.

III-1. Effets comparés de différentes souches d'*Agrobacterium rhizogenes*

A. rhizogenes, bactérie à Gram négatif, fait partie de la famille des *Rhizobiaceae*. Dans la littérature, elle est souvent utilisée en culture *in vitro* afin d'obtenir des racines transformées productrices de métabolites secondaires (Boitel-Conti *et al.*, 1995, 2000 ; Palazon *et al.*, 1997 ; Cusido *et al.*, 1998 ; Zehra *et al.*, 1998 ; Giri *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2005 ; Diop, 2007). Nous avons voulu étudier le potentiel d'un tel microorganisme sur les plantes en hydroponie. Ce travail a été réalisé sur 5 souches différentes.

III-1.1 Croissance végétative

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'importance des bactéries de type *A. rhizogenes* sur la croissance et la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques. Pour ce faire, des plantes ont été installées en serre dans des bacs d'hydroponie contenant 30L de solution nutritive (18 plantes par bac et par modalité). Avant la mise en culture, les différentes souches d'*A. rhizogenes* (ATCC : TR7, 11325, 15834 et TR107) ont été cultivées pendant 3 jours en boîtes de Pétri (9cm de diamètre) contenant le milieu YMB. Les colonies de bactéries ont ensuite été prélevées et diluées dans de l'eau distillée stérile; 100mL de cette solution bactérienne ont ensuite été ajoutés dans la solution nutritive. La concentration bactérienne finale est ainsi d'environ de 3×10^5 bactéries/mL. Nous avons ensuite examiné les paramètres de croissance des plantes au cours du temps.

Après 21 jours de culture, la surface foliaire totale des plantes était de 140 cm²/plante pour les plantes inoculées avec TR7, environ 120cm² pour les plantes inoculées avec TR107, 11325 et 15834 et, seulement 80 cm² pour les plantes témoins (figure 49). Les plantes bactérisées ont une surface foliaire (de 1,5 à 1,7 fois) plus importante que les plantes témoins.

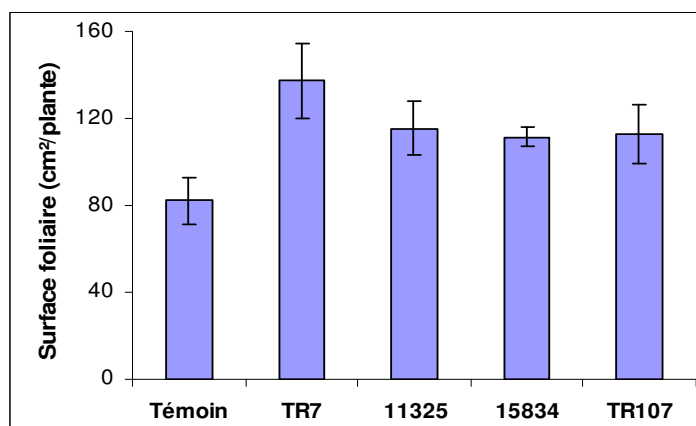
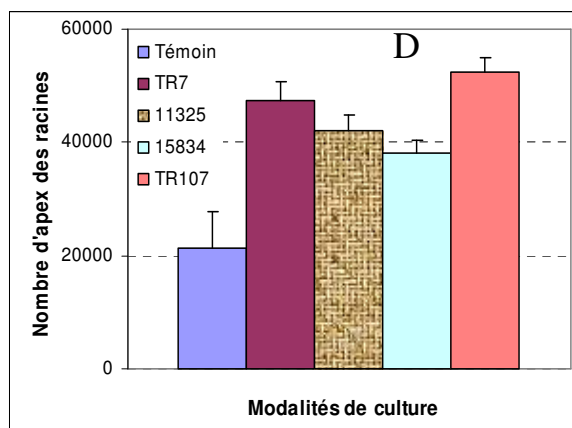
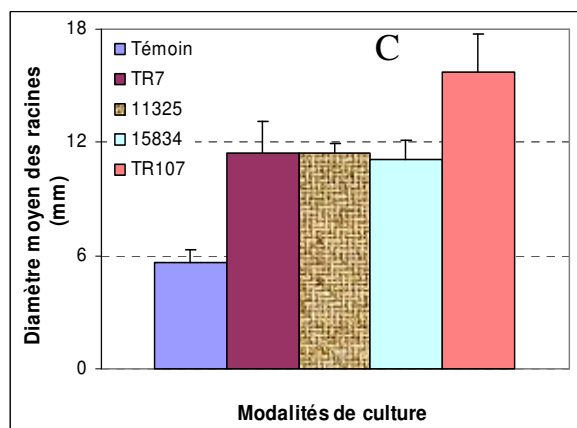
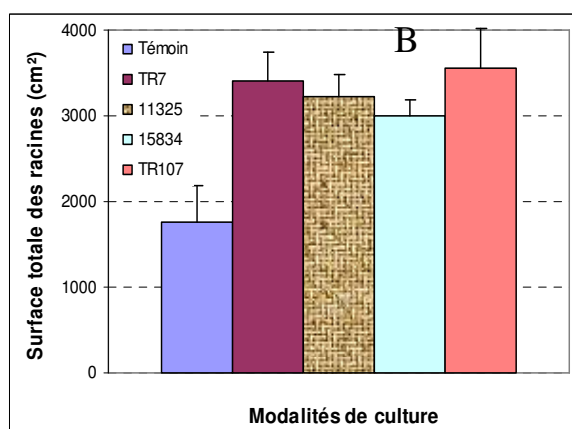
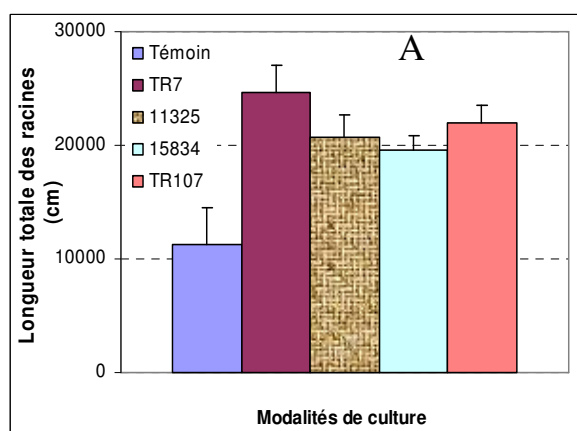


Figure 49 : Surface foliaire totale des plantes au bout de 3 semaines de culture avec ou sans apport d'agrobactéries dans la solution nutritive.

Nous constatons également que les souches d'*A. rhizogenes* stimulent le développement et la croissance des racines : la longueur totale, la surface totale, le diamètre moyen, le nombre d'apex, la ramification et la masse racinaires augmentent significativement pour les plantes bactérisées (figures 50A-F). La différence mesurée entre les souches n'est pas statistiquement significative.



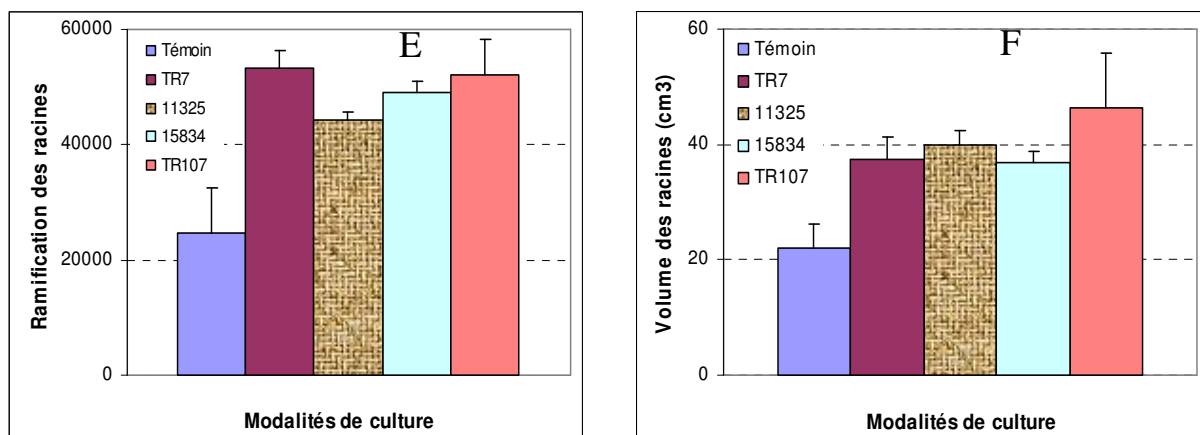


Figure 50 : Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramification (E) et volume totale (F) des racines mesurés après 3 semaines de culture sur des plantes en hydroponie, avec ou sans apport d'*Agrobacterium rhizogenes*.

III-1.2 Production de biomasse

Toutes les plantes bactérisées ont, en moyenne, une biomasse fraîche et sèche (figures 51, 52) plus élevée que les témoins. Après 35 jours de culture, les plantes témoins donnent une production de matière fraîche/m² de 13,5 kg contre 28,7 ; 24,9 et 20,9 kg/m² de matière fraîche pour les plantes inoculées respectivement avec TR7, TR107 et 11325-15834, (figure 51). La biomasse sèche, au bout de 35 jours de culture, est en moyenne de 22,5 ; 19,7 ; 17 et 8,1 g/plante, soit respectivement 2,3 ; 2 ; 1,7 et 0,8 kg/m² de matière sèche pour les cultures inoculées avec TR7, TR107, 11325-15834 et témoin (figure 52). Compte-tenu de la variabilité observée, toutes les souches présentent une différence significative par rapport au témoin. Ces souches d'*A. rhizogenes* ont provoqué une amélioration de la croissance des parties racinaires. TR7 a donné le meilleur résultat (rendement) en terme de biomasse fraîche et de biomasse sèche. L'effet "type de bactérie" n'est cependant pas significatif (figure 52).

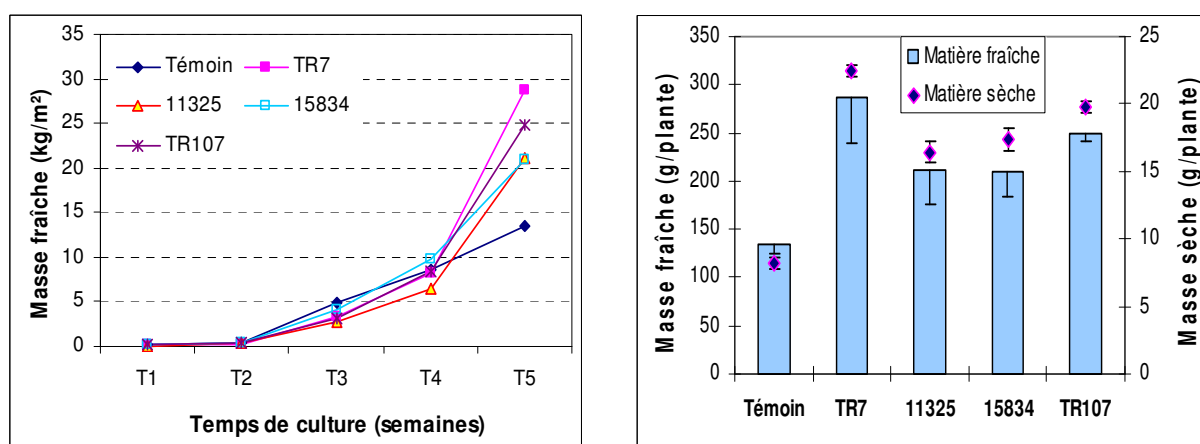


Figure 51: Effet de l'apport de différentes souches d'agrobactéries (TR7, 11325, 15834,

TR107) sur la production de biomasse fraîche au cours du temps.

Figure 52: Masse fraîche et sèche des plantes au bout de 5 semaines de culture après apport

de différentes souches d'agrobactéries (TR7, 11325, 15834, TR107).

III-1.3 Production de métabolites secondaires

Après avoir analysé l'influence des *A. rhizogenes* sur la croissance et le développement des plantes, nous avons mesuré les teneurs en H&S dans les différents organes.

La concentration en H&S dans les plantes traitées est supérieure à celle du témoin. La plus haute valeur est obtenue avec la souche TR7. Elle est augmentée de 4,7 fois pour l'hyoscyamine et de 2,9 fois pour la scopolamine par rapport aux témoins (figure 53). En moyenne, la teneur en H&S dans la plante inoculée avec la souche TR7 est multipliée par 3,1 comparativement au témoin, et par 2,7 ; 2,1 ; 1,4 fois, respectivement pour les souches 11325, 15834 et TR107.

La présence des agrobactéries dans le milieu de culture de *Datura innoxia* a permis de tripler la productivité en métabolites secondaires pour les plantes hydroponiques. En effet, la quantité en H&S produite dans les plantes traitées avec la souche TR7 est de 2,8g/m²/35jours alors qu'elle n'est que de 0,7 pour les plantes témoins (figure 54).

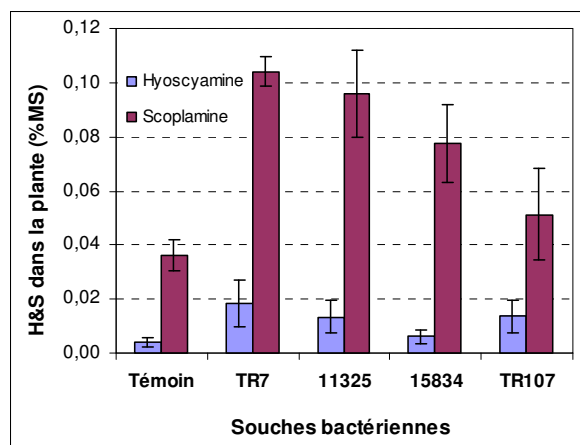


Figure 53: Effet des souches d'*A. rhizogenes* sur la teneur en H&S dans les plantes au bout de 35 jours de culture.

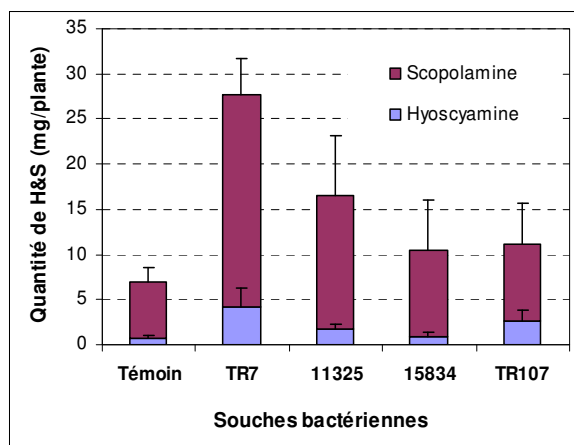


Figure 54: Effet des souches d'*A. rhizogenes* sur la quantité d'alcaloïdes dans les plantes au bout de 35 jours de culture.

En conclusion, la croissance de *Datura innoxia* est largement favorisée par l'inoculation d'*A. rhizogenes*. La souche TR7 a donné le meilleur résultat tant en termes de croissance que de stimulation de la production de H&S. La productivité alcaloïdique a été quasiment multipliée par 4 dans cette condition.

Une série d'autres expérimentations comparables a été mise en oeuvre en phytotron en conditions contrôlées. Les résultats obtenus sur la centaine de plantes testées ont confirmé

ceux présentés ci-dessus. Il semble donc y avoir un intérêt majeur à explorer davantage le potentiel de l'inoculation des cultures par des agrobactéries.

III-2. Effets de la souche *A. rhizogenes* TR7

Avant de tenter de préciser les modalités d'action de la bactérie, cette partie du travail a pour but de confirmer, à l'échelle pilote, les résultats obtenus précédemment avec TR7. L'effet d'*A. rhizogenes* sur la croissance, le développement, l'accumulation de biomasse ainsi que la production d'alcaloïdes tropaniques de la plante a donc été évalué en serre à grande échelle.

Des plantes témoins et des plantes traitées avec la souche TR7 ont été installées en systèmes pilote (5m X 0,6m X 10cm) dans les conditions de serre. Deux pilotes de culture sont installés en parallèle ; chaque modalité est constituée de 7 plaques de 36 plantes (soit un total de 252 plantes). Chaque dispositif contient 200L de solution nutritive. Avant inoculation du pilote hydroponique, la culture bactérienne est préparée dans les mêmes conditions que l'expérience précédente. Les colonies bactériennes de quatre boîtes de Pétri sont grattées et récupérées dans 250 mL de solution nutritive stérile. Après homogénéisation, le bouillon est versé dans le milieu jusqu'à l'obtention d'une concentration d'environ $1,5 \cdot 10^8$ bactéries par litre de solution nutritive finale ($1,5 \cdot 10^5$ UFC/mL).

Tout au long de la culture, la température et la conductivité de la solution nutritive sont mesurées (trois fois par semaine, moyenne de trois mesures faite au thermomètre-conductimètre). Sur l'ensemble de l'expérience, la température moyenne des deux solutions nutritives était de 14°C pour une conductivité de 2,7mS/cm (figure 55). L'homogénéité des températures et de la conductivité de la solution nutritive des deux modalités a été enregistrée.

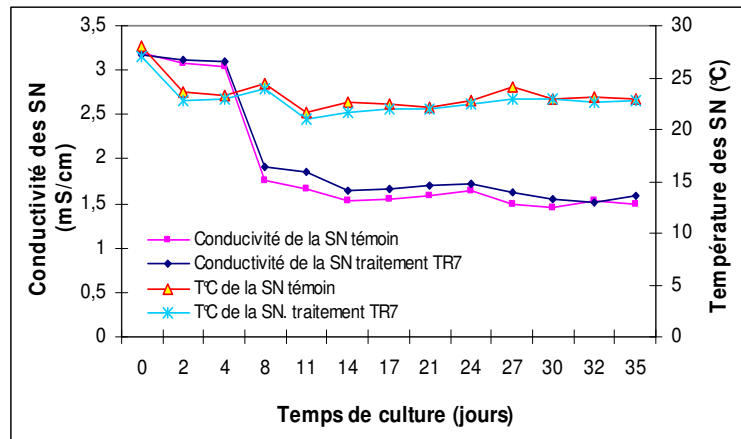


Figure 55: Evolution de la conductivité et de la température des solutions nutritives durant la croissance de *Datura innoxia* Mill. cultivés en pilotes hydroponiques avec ou sans apport initial d'*Agrobacterium rhizogenes* TR7 (ArTR7).

III-2.1 Croissance végétative

Les observations réalisées sur 32 jours de culture montrent un effet significatif de *A. rhizogenes* TR7 sur la croissance des parties aériennes et racinaires des plantes (planche 25). En effet, une hauteur maximale de l'ordre de 55cm est atteinte pour les daturas témoins contre 68cm pour les daturas inoculés avec *A. rhizogenes* TR7 (figure 56A). L'effet significatif du traitement est enregistré dès le 15^{ème} jour de culture.



Planche 25: Racines de *Datura innoxia* après 15 jours de culture en système hydroponique pilote: (a) culture témoin, (b) culture inoculée avec ArTR7.

Après 32 jours de culture, le nombre total moyen de feuilles est de 28 dans le cas des plantes avec TR7 et de 22 chez le témoin (figure 56B). L'influence du traitement est significative à partir du 8^{ème} jour.

La surface foliaire des plantes, mesurée au 22^{ème} jour, atteint des valeurs supérieures à 57cm²/plante pour les témoins contre 100cm²/plante pour les traitées (figure 57).

A partir du 8^{ème} jour, on note déjà un développement racinaire plus important pour les plantes inoculées (figure 58).

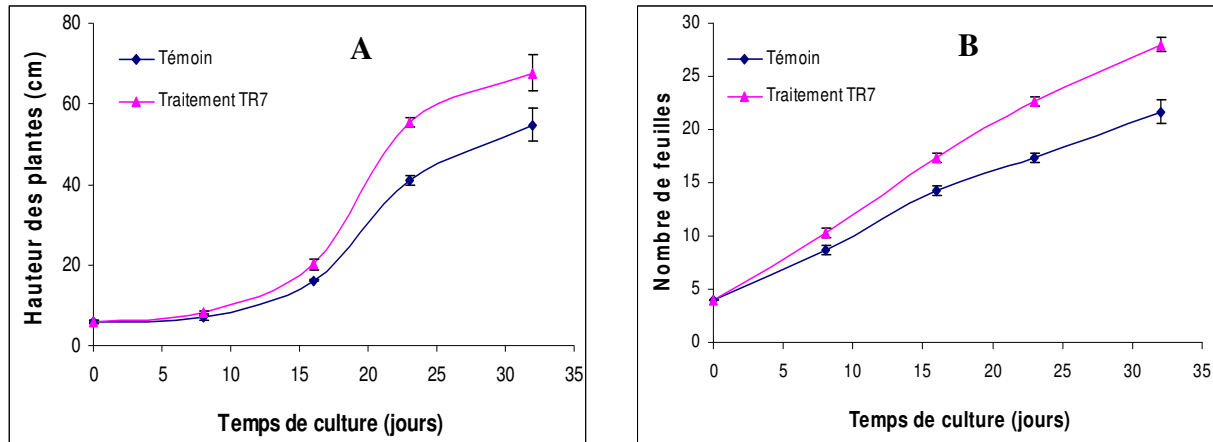


Figure 56 : Evolution de la hauteur des plantes (A) et de leur nombre de feuilles (B) au cours d'une culture hydroponique pilote réalisée avec ou sans apport d'agrobactéries (souche TR7).

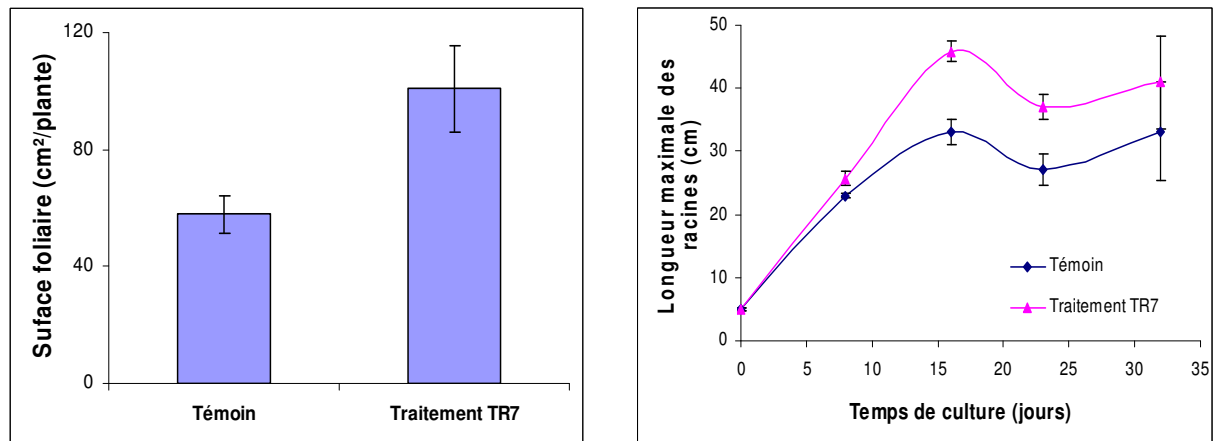


Figure 57: Surface foliaire de plantes cultivées en pilote hydroponique avec (traitement TR7) ou sans inoculation par *A. rhizogenes* TR7 (témoin); mesures réalisées au bout de 3 semaines de culture).

Figure 58: Evolution de la longueur maximale apparente des racines de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec (traitement TR7) ou sans inoculation par *A. rhizogenes* TR7 (témoin).

L'analyse comparée de la morphologie racinaire, réalisée à 21 jours avec le logiciel Winrhizo, nous montre des différences significatives au niveau de la longueur, de la surface, du nombre d'apex, de la ramification et, par voie de conséquence, du volume des racines (figures 59A-F). Les plantes cultivées en milieu inoculé ont une croissance racinaire supérieure à celle des plantes non inoculées et elles présentent une architecture différente avec plus d'apex et de ramifications.

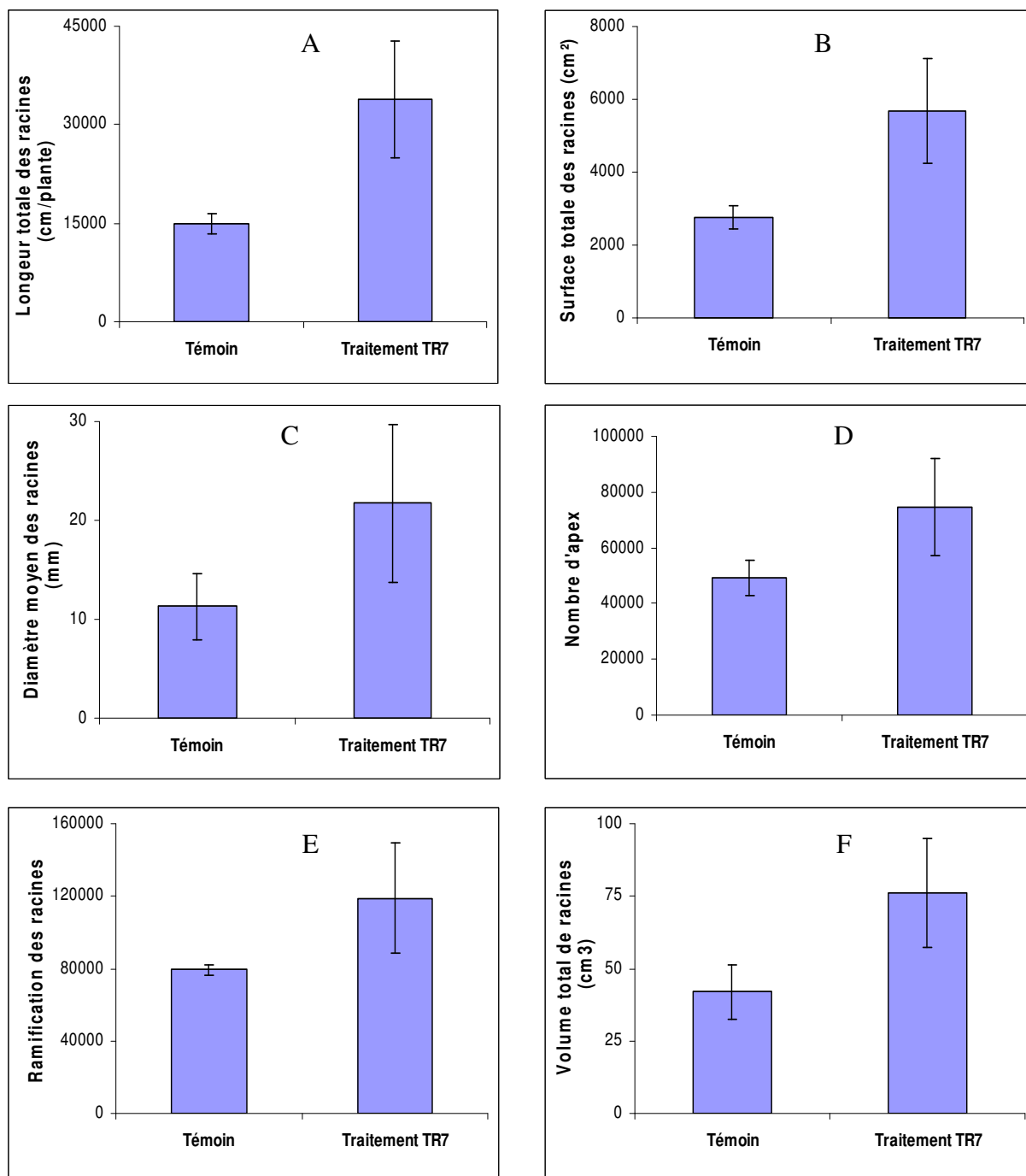


Figure 59: Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramification (E) et volume total (F) des racines de plantes cultivées depuis 21 jours en pilote hydroponique avec ou sans inoculation par *A. rhizogenes* TR7.

III-2.2 Production de biomasse

L'inoculation des pilotes hydroponiques par *Agrobacterium* a un effet significatif (seuil de 5%) sur le rendement en biomasse dès la 2^{ème} semaine. Après 32 jours, le système a produit 7 et 10,2 kg MF/m² pour le témoin et pour les plantes traitées avec *Agrobacterium* respectivement. Ceci correspond à 1100g MS/m² et 1900g MS/m² avec une densité de 100

plantes/m² (figure 60). La présence d'*A. rhizogenes* TR7 a donc permis d'obtenir une augmentation de 73% de la MS par rapport au témoin. Elle a également stimulé le développement du système racinaire en hydroponie. Les plantes traitées présentent une biomasse racinaire supérieure à celle des plantes témoins. Au 32^{ème} jour, le rapport des parties racinaires/parties aériennes (root/shoot ratio) est de 0,45 pour les cultures inoculées et de 0,39 pour les cultures témoins. L'inoculation de la solution nutritive affecte l'architecture de la plante au profit des parties racinaires, et a un rôle favorable sur la croissance racinaire.

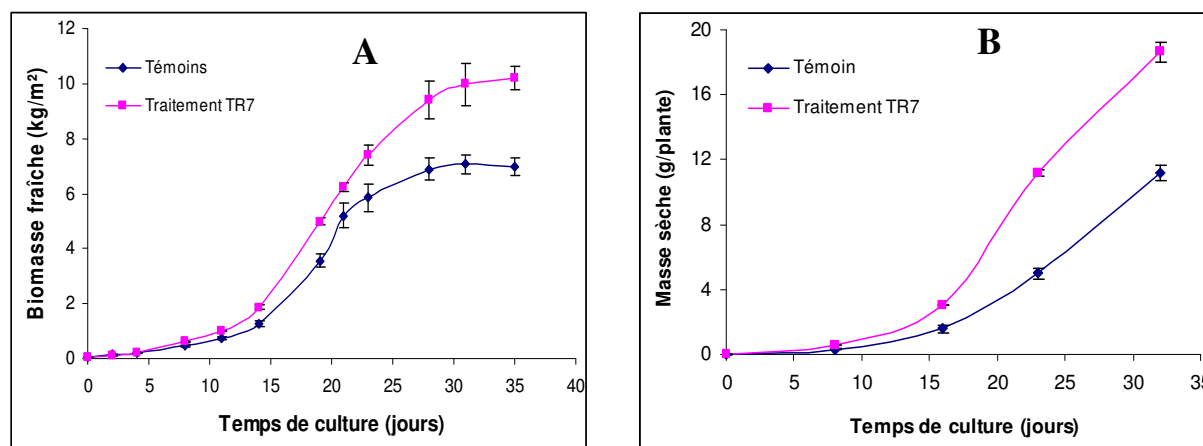


Figure 60 : Evolution de la biomasse racinaire de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec (traitement TR7) ou sans (témoins) inoculation par *A. rhizogenes* TR7: (A) biomasse fraîche, (B) biomasse sèche.

III-2.3 Production de métabolites secondaires

Nous avons mesuré la teneur en hyoscyamine et en scopolamine, dans les parties aériennes et racinaires des plantes. La concentration en H&S augmente avec l'âge des plantes (figure 61) et, en présence de *Ar*TR7, elle est plus importante dans les parties aériennes et racinaires. L'effet significatif de cette bactérie conduit à une accumulation de d'hyoscyamine 2,5 fois plus importante que chez les plantes témoins à 32 jours (figures 61A-B). De même, la teneur en scopolamine dans les plantes bactérisées est 2 fois supérieure à celle des plantes témoins (figure 62A-B).

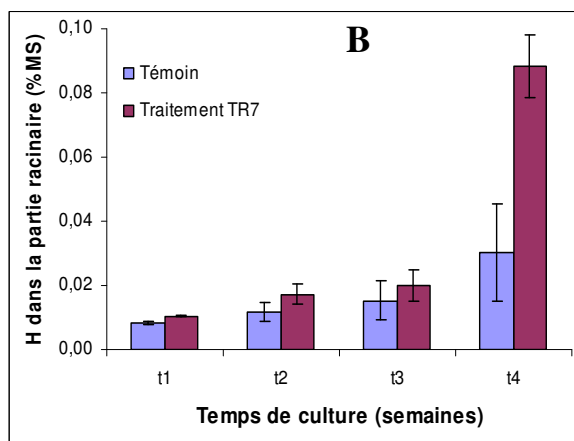
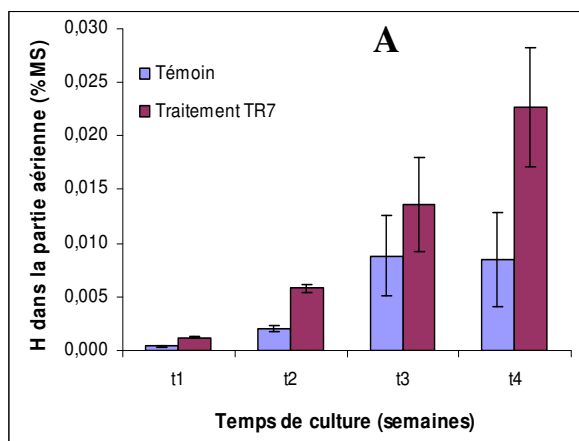


Figure 61: Teneur en hyoscyamine dans les parties aériennes (A) et parties racinaires (B) de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec "traitement TR7" ou sans ajout d'agrobactéries "témoins".

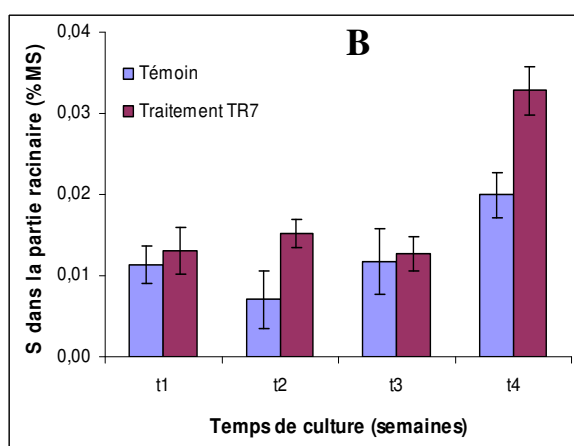
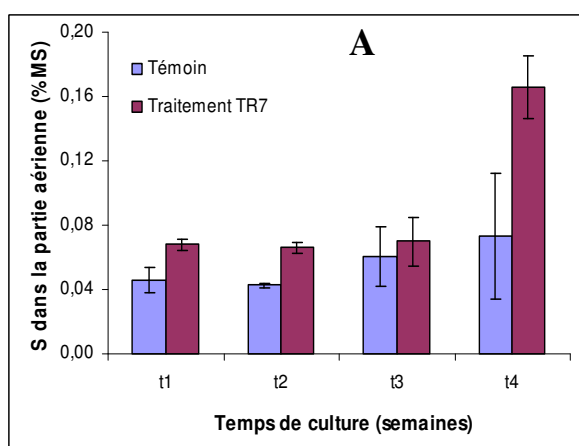


Figure 62: Teneur en scopolamine dans les parties aériennes (A) et parties racinaires (B) de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec "traitement TR7" ou sans ajout d'agrobactéries "témoins".

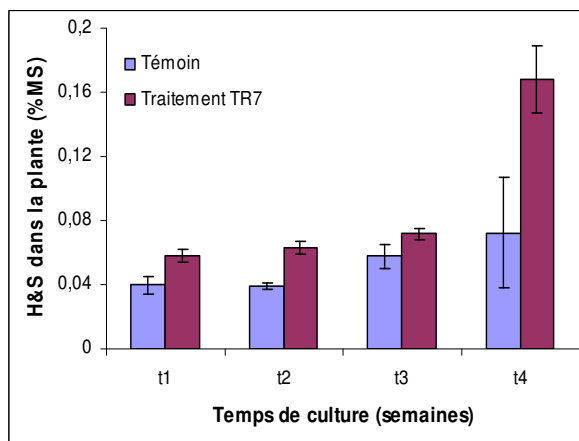


Figure 63: Teneur en H&S dans la plante entière au cours de la culture en pilotes hydroponiques avec ou sans ajout d'agrobactéries (respectivement "traitement TR7" et "témoins").

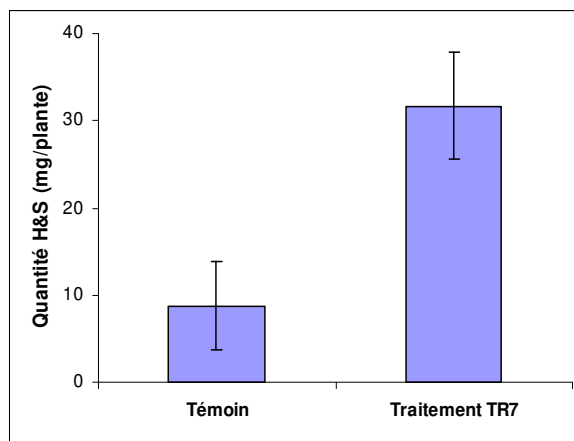


Figure 64 : Productivité en H&S dans la plante entière au cours de la culture en pilotes hydroponiques avec ou sans ajout d'agrobactéries (respectivement "traitement TR7" et "témoins").

La teneur en alcaloïdes tropaniques (H&S) n'a pas augmenté pendant les trois premières semaines. A 32 jours, elle est de 0,17 et 0,07%MS, respectivement pour les plantes traitées et

les plantes témoins (figure 63). L'accumulation des deux métabolites dans les plantes traitées a été améliorée de plus de 2,4 fois par rapport aux plantes témoins. Le traitement bactérien a permis une accumulation moyenne de 31,7 mg de H&S/plante alors qu'elle n'est que de 8,8 (mg de H&S/plante) pour le témoin (figure 64). La productivité alcaloïdique est donc multipliée par 3,6 dans la plante traitée après 32 jours de culture.

III-2.4 Evolution de la microflore dans la solution nutritive

L'estimation du nombre de microorganismes se développant dans la solution nutritive a été effectuée comme décrit dans la partie "matériels et méthodes". Le premier prélèvement de solution nutritive a été réalisé un jour après la mise en place des pilotes de culture; les autres ont été faits toutes les semaines suivantes. Le dénombrement de colonies (exprimé en UFC/mL) est généralement établi à partir des dilutions 10^{-2} ou 10^{-3} . Les graphiques (figures 65 A et B) sont exprimés en échelle logarithmique pour obtenir une représentation adaptée aux données expérimentales.

En début d'expérience, nous avons dénombré $3 \cdot 10^3$ et $6 \cdot 10^3$ UFC/ml après 24 heures d'incubation pour les cultures inoculées avec *A. rhizogenes* TR7 et les cultures témoins non-inoculées. Ces valeurs caractérisent la microflore immédiatement installée dans le pilote, en particulier à partir des microorganismes provenant de l'eau du robinet et des contaminants issus des matériaux utilisés et de l'air ambiant dans la serre.

Un second dénombrement effectué au bout de 48h d'incubation donne un nombre de $2,8 \cdot 10^5$ UFC/mL dans la solution nutritive inoculée et $0,8 \cdot 10^5$ UFC/mL dans la culture témoin. Ces valeurs sont censées intégrer *ArTR7* dont les colonies se développent plus lentement sur boîtes de Pétri. Elles correspondent bien à une inoculation de l'ordre de $1,5 \cdot 10^5$ bactéries par mL dans la modalité "avec agrobactéries" où la population microbienne est 3,5 fois supérieure à celle de la solution non infectée.

Au cours de la culture des plantes, la densité microbienne "48h" stagne quasiment avec le temps. Le nombre de microorganismes à croissance rapide (colonies visible dès 24h) est relativement stable aussi, si on exclut un pic à la seconde semaine pour les cultures inoculées. Ce pic peut être lié à n'importe quel élément fortuit, mais en aucun cas à un apport d'éléments nutritifs dans le pilote lors de l'inoculation. On peut considérer qu'une part des agrobactéries ajoutées aurait donné une nécromasse ayant servi de substrat pour le développement d'autres bactéries à croissance plus rapide. Cependant, une telle hypothèse aurait alors dû se traduire

par une baisse au moins légère du nombre de microorganismes à croissance "lente" à cette même semaine 2, or ce n'est pas le cas.

D'un point de vue qualitatif, nous avons observé une diversité de colonies se formant sur les milieux de cultures gélosées: au maximum 25 types de colonies différentes d'après leur forme, leur couleur et leur aspect. Cependant, aucune différence apparente entre les deux modalités n'a pu être mise en évidence.

Une analyse plus poussée (galeries API, plaques biolog, RISA ...) aurait éventuellement pu permettre d'aller plus loin dans cette analyse.

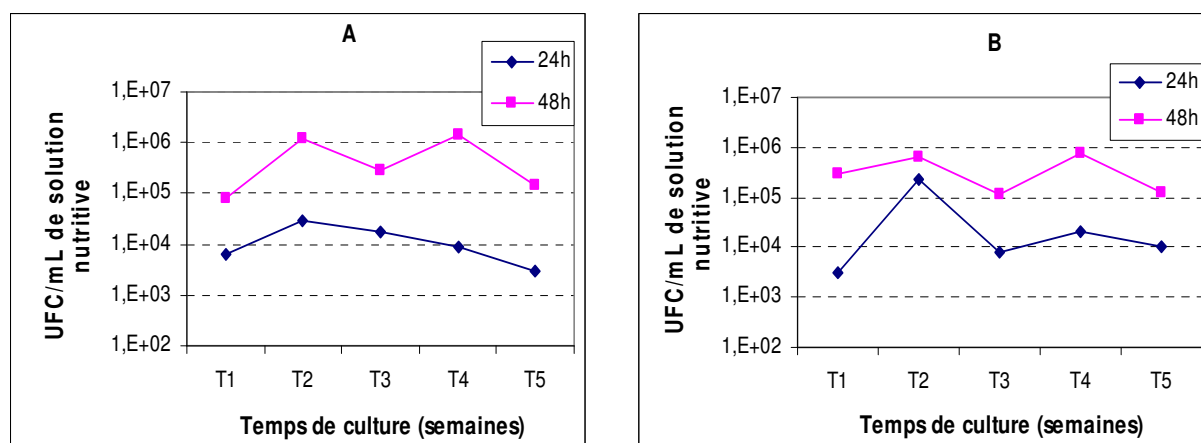


Figure 65 : Evolution du nombre de microorganismes dans la SN de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec (B) ou sans (A) ajout d'ArTR7; le dénombrement sur boîte de Pétri (milieu TSA) est effectué après 24h ou 48h d'incubation à 28°C. Le résultat est exprimé en UFC/ml.

III-2.5 Conclusion partielle

L'inoculation de cultures hydroponiques de *Datura innoxia* par différentes souches d'*Agrobacterium* a conduit à une amélioration de la croissance, de la biosynthèse et de l'accumulation d'alcaloïdes dans la plante. *ArTR7* s'est révélée être la plus efficace parmi les candidates testées et nous avons confirmé l'intérêt de cette souche en pilote à grande échelle.

Compte-tenu de la littérature abondante portant sur l'utilisation *in vitro* d'*A. rhizogenes*, nous pensons que l'utilisation des bactéries de souche sauvage pourrait donner lieu à des transferts naturels de gènes, induisant l'obtention d'un système racinaire chimérique regroupant des racines normales et des racines génétiquement transformées. Ces dernières présenteraient un taux de synthèse phytohormonal élevé et induiraient une modification morphologique et métabolique de la plante.

Nous avons donc cherché à tester cette hypothèse en utilisant des souches d'*Agrobacterium* intégrant un système de gène rapporteur.

III-3. Utilisation de gènes rapporteurs *egfp* et *gus* en vue de comprendre l'effet de *A. rhizogenes* TR7

Dans le but d'élucider le rôle de *A. rhizogenes* TR7, nous avons élaboré une souche *ArTR7* intégrant un plasmide contenant un gène rapporteur de type *egfp* et une autre contenant *gus* (détail dans la partie "matériels et méthodes"). Ensuite, des plantes ont été installées en système hydroponique en bac PVC à raison de 18 plantes par bac rempli par 30L de solution nutritive. Deux bacs de culture correspondant à deux répétitions composent chaque traitement. Les trois souches bactériennes testées (*TR7* sauvage, *TR7-gus* et *TR7-egfp*) ont été cultivées en milieu YMB liquide (50mg/L de kanamycine ajoutée pour *TR7-gfp*; 50mg/L d'ampicilline dans le cas de *TR7-gus*). Ces cultures sont maintenues pendant une journée à 27-28°C sous agitation de 120rpm. Puis les bouillons sont centrifugés pour enlever le milieu ($DO_{600nm} \sim 1,5$) et le culot est repris avec de l'eau distillée. 40mL de cette suspension sont additionnés à un bac de culture (concentration estimée: $0,7 \cdot 10^5$ bactéries/mL de solution nutritive).

III-3.1 Croissance végétative et production de biomasse

Au cours de la culture, la hauteur des plantes des quatre modalités augmente progressivement au cours du temps. Les plantes témoins sont celles qui présentent la croissance en hauteur la plus faible, soit 20 cm, alors que les plantes bactérisées approchent des valeurs de 40 cm au bout de 5 semaines de culture (figure 66A).

Le nombre de feuilles et la hauteur des plantes ont augmenté de la même manière. Après 5 semaines, la différence de développement du nombre de feuilles entre les plantes bactérisées et les témoins devient significative : 35-40 contre 25 feuilles à 35 jours de culture (figure 66B).

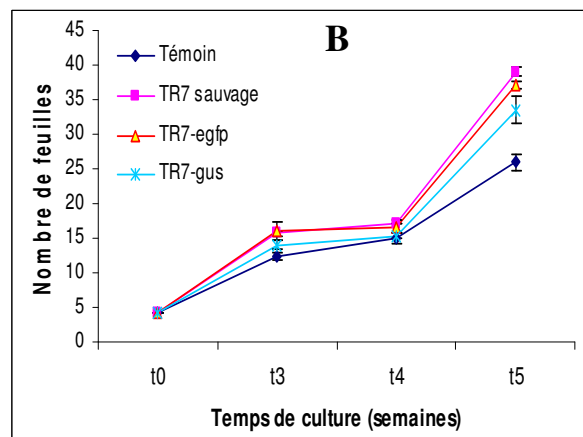
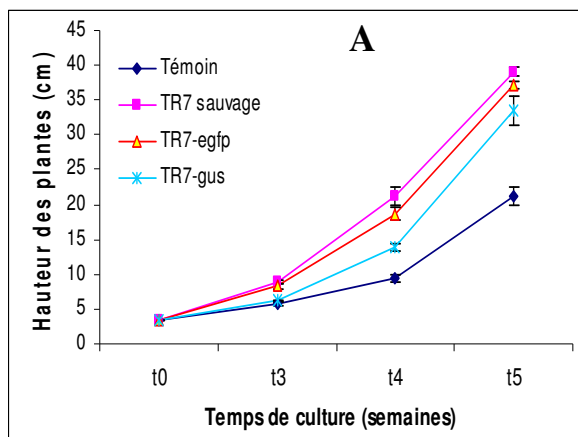


Figure 66: Evolution de la hauteur (A) et du nombre de feuilles (B) des plantes cultivées après inoculation des différentes souches d'*A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) dans la solution nutritive.

A. rhizogenes TR7 (sauvage et modifiées) a un effet visible sur le système racinaires des plantes (planche 26).

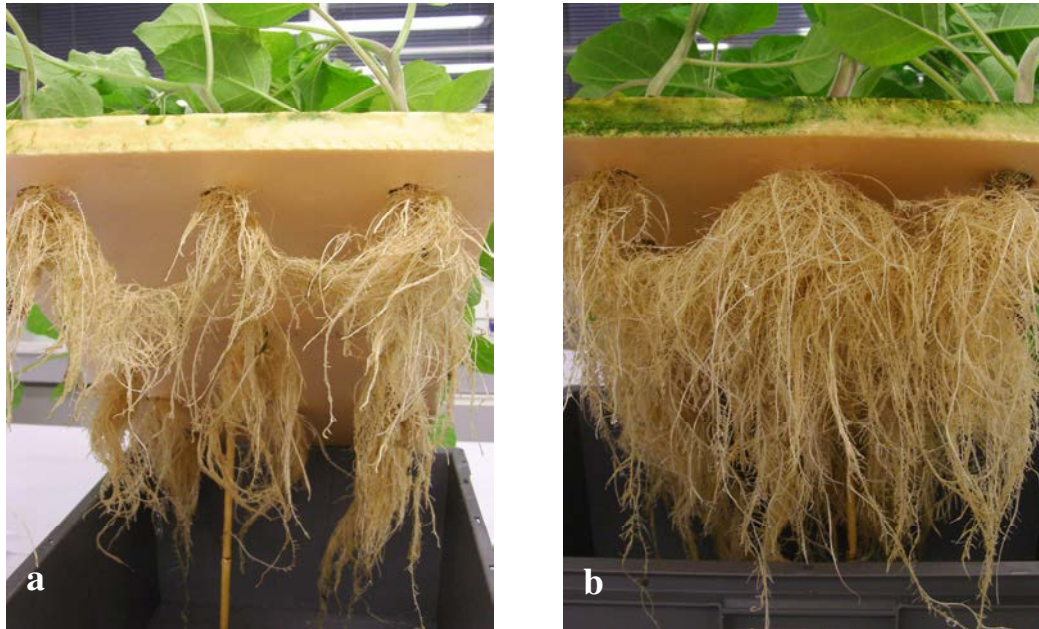


Planche 26: Racines des plantes témoins (a) et des plantes co-cultivées (b) avec *A. rhizogenes* TR7-*egfp* au bout de 4 semaines en hydroponie.

L'ensemble des plantes avec leur support (radeau en polystyrène contenant les plantes) a été pesé deux fois par semaine et la matière sèche totale a été quantifiée à partir de prélèvement destructifs à 0, 3, 4 et 5 semaines de culture (figures 67A-B).

Après 5 semaines, pour les plantes bactérisées avec TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*), nous avons obtenu des valeurs moyennes de 11 kg/m² de MF, alors que celle des plantes témoins est de 7 kg/m², soit 10 et 3g de MS par plante pour les plantes traitées et les plantes non traitées, respectivement. L'analyse statistique des résultats montre que la présence de ces agrobactéries dans la solution nutritive a eu un effet très significatif sur la croissance et également sur le rendement en biomasse totale de la plante par rapport aux plantes témoins. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes entre les souches utilisées.

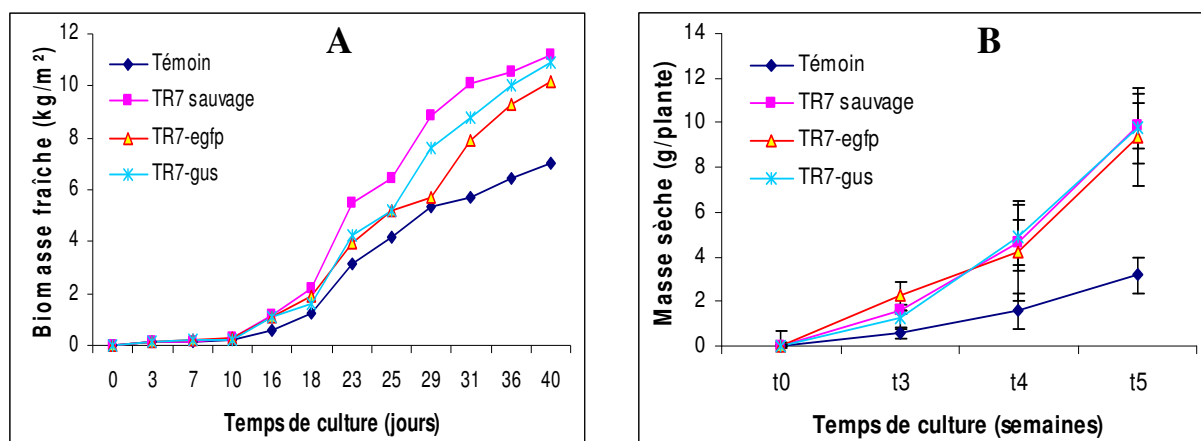


Figure 67: Evolution de la masse fraîche (A) et la masse sèche (B) des plantes cultivées sans (témoin) ou après ajout de différentes souches d'*A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) dans la solution nutritive.

Par ailleurs, nous avons réalisé des observations au microscope à fluorescence sur les racines de plantes mises en contact avec *ArTR7-egfp*. Des zones révélant la présence de la protéine EGFP ont pu être mises en évidence (planche 27a). *A contrario*, aucune fluorescence verte n'a pu être observée chez les témoins (racines témoins, racines *ArTR7*, racines *ArTR7-gus*).

De la même manière, nous avons mis à incuber des racines de plantes ayant été en contact avec *ArTR7-gus* et des zones de coloration bleue ont pu apparaître (planche 27b). Aucune coloration équivalente n'a pu être observée chez les témoins (racines témoins, racines *ArTR7*, racines *ArTR7-egfp*). Il semble donc bien y avoir eu transformation génétique des plantes au moins à quelques endroits de leur système racinaire lorsque celles-ci ont été en contact avec les agrobactéries.

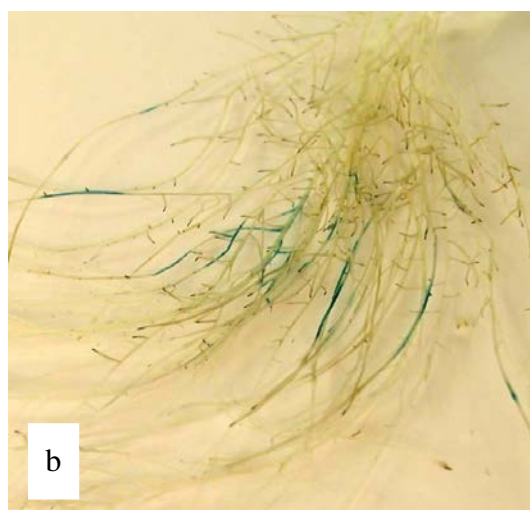
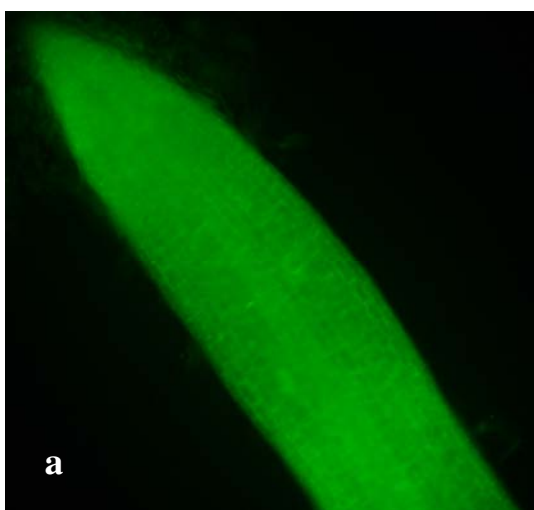


Planche 27: racines de plantes "*ArTR7-egfp*" (a) et "*ArTR7-gus*" (b) après trois semaines de culture hydroponique en serre. Observations au microscope à fluorescence (a) et sous loupe binoculaire après incubation avec le substrat X-gluc (b).

III-3.2 Production de métabolites secondaires

Après avoir analysé l'influence des souches sur la croissance et la production de biomasse, nous avons analysé la teneur en H&S dans les parties aériennes et les racines. Elle est améliorée chez toutes les plantes "bactérisées" après 21 et 35 jours d'inoculation (figure 70). L'effet du traitement avec les souches "TR7" apparaît clairement dans cette analyse. Les teneurs en H&S dans les parties aériennes et racinaires sont significativement plus importantes (2,1 fois supérieures, figures 68-69) que dans les témoins à 21 et 35 jours.

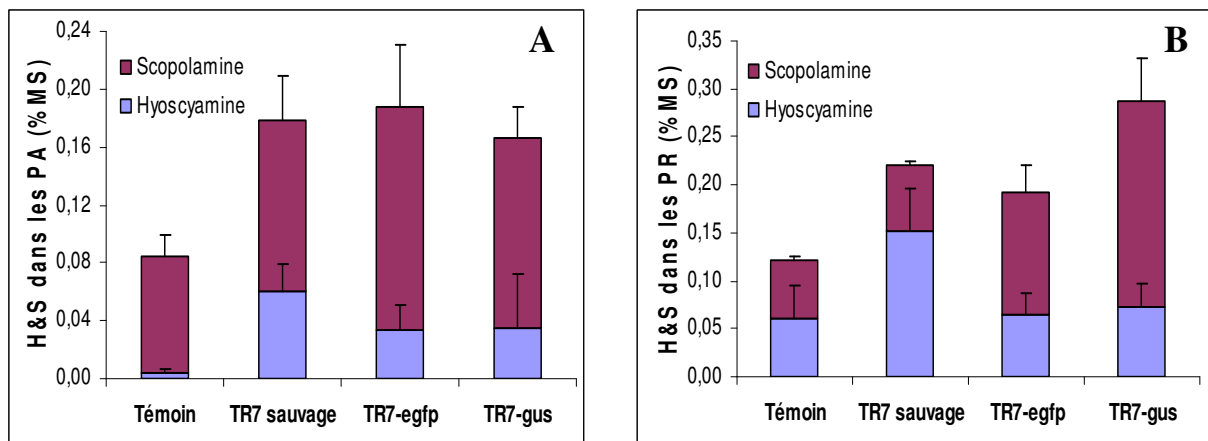


Figure 68: Teneur en H&S dans les parties aériennes (A) et racinaires (B) de plantes inoculées avec différentes souches de *A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) à 21 jours de culture.

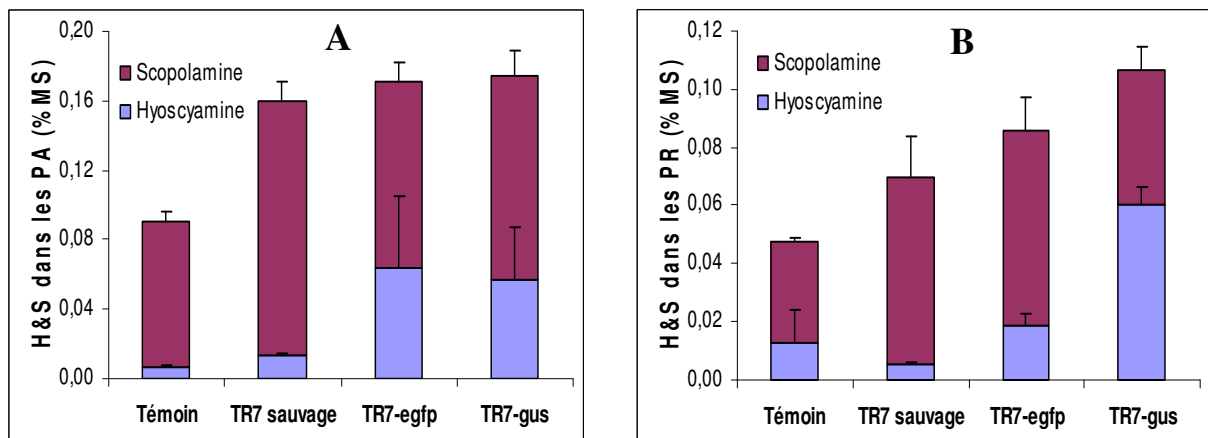


Figure 69: Teneur en H&S dans les parties aériennes (A) et racinaires (B) de plantes inoculées avec différentes souches de *A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) à 35 jours de culture.

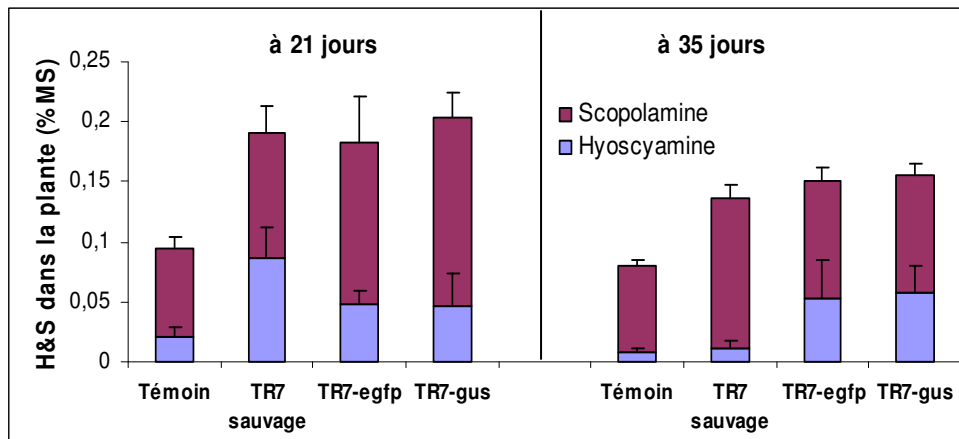


Figure 70: Teneur globale en H&S (ensemble de la plante) mesurée sur des cultures hydroponiques inoculées avec différentes souches de *A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) à 21 et 35 jours de culture.

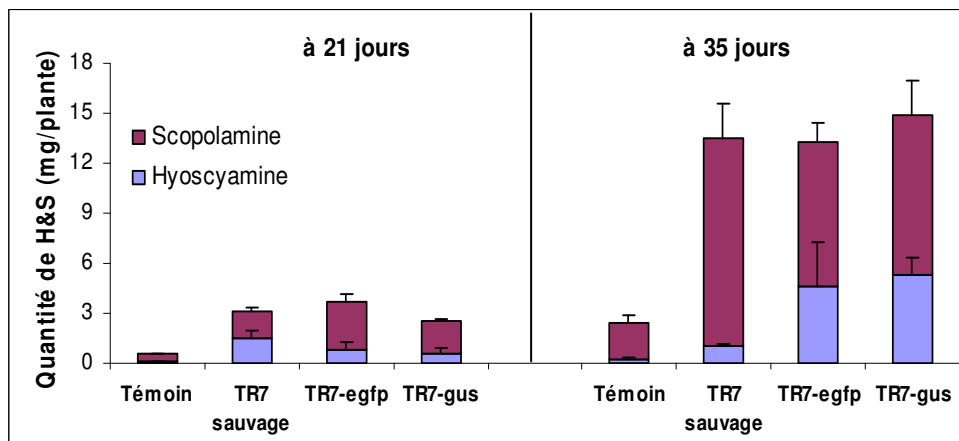


Figure 71: Quantité de H&S dans des plantes hydroponiques après 21 et 35 jours de culture. Les solutions nutritives ont été inoculées avec différentes souches (sauvage, *egfp* et *gus*) de *A. rhizogenes* TR7. Le témoin n'a pas été inoculé.

De la même façon, la quantité de H&S produite dans les plantes bactérisées est de 6-7 fois supérieure à celle des plantes témoin (figure 71). Au bout de 35 jours d'infection, la productivité alcaloïdique est donc améliorée de 6-7 fois, quelle que soit la souche utilisée.

Le fait d'avoir modifié les souches microbiennes en intégrant un plasmide supplémentaire n'a pas eu d'effet délétère sur le comportement d'*Agrobacterium* vis-à-vis de nos plantes et de leur synthèse et accumulation d'alcaloïdes.

III-3.3 Evolution de la microflore dans la solution nutritive

Comme nous l'avons vu précédemment, une microflore s'installe dans les solutions nutritives des cultures hydroponiques réalisées en serre. Dans le but de déterminer l'impact de l'apport d'un inoculum bactérien supplémentaire (ici *Ar*TR7), nous avons réalisé une

estimation du nombre de microorganismes se développant dans la solution nutritive et, chaque semaine, une comparaison entre les modalités. Le calcul du nombre de colonies en UFC/mL est réalisé à partir des dilutions 10^{-2} ou 10^{-3} . Le dénombrement des colonies microbiennes a été effectué après culture sur boîte de Pétri pendant 24h pour comptabiliser les microorganismes à croissance rapide et, après 48h, pour visualiser en plus les agrobactéries à croissance plus lente.

Au début de l'expérience (après ajout des agrobactéries dans les solutions nutritives), le nombre de colonies se situe entre $1,3.10^5$ et $0,7.10^5$ /mL, au bout de 24h d'incubation à 28°C , respectivement pour les cultures témoins sans traitement et les cultures inoculées avec les souches d'*A. rhizogenes*. La valeur de dénombrement à 48h atteint $0,33.10^6$ /mL chez les cultures témoins et $2,1.10^6$ /mL dans les solutions nutritives infectées par un apport initial de $1,5.10^5$ *A. rhizogenes* par millilitre (figure 72B).

A partir de la deuxième semaine jusqu'à la fin de l'expérience, nous observons des variations légères au cours du temps quelle que soit la modalité. Pour les cultures témoins, les quantités moyennes des microorganismes à 24 et 48 heures passent de $0,78.10^5$ à $0,26.10^6$ UFC/mL de solution nutritive. Alors que pour les cultures inoculées, ces valeurs atteignent $0,98.10^5$ et $0,56.10^6$ UFC/mL (figures 72A-B).

Mise à part la valeur témoin-semaine1-48h, la population microbienne évolue de façon comparable tout au long de la culture pour les quatre modalités testées. Les courbes de dénombrement à 24h et à 48h ont un profil identique. On constate une relative stabilité des microorganismes à croissance rapide et une légère diminution pour la population comptabilisée après 48h de culture sur boîte de Pétri. Ni l'ajout de bactéries ni le type de bactéries n'a d'effet significatif sur la dynamique des populations microbiennes dénombrées ici.

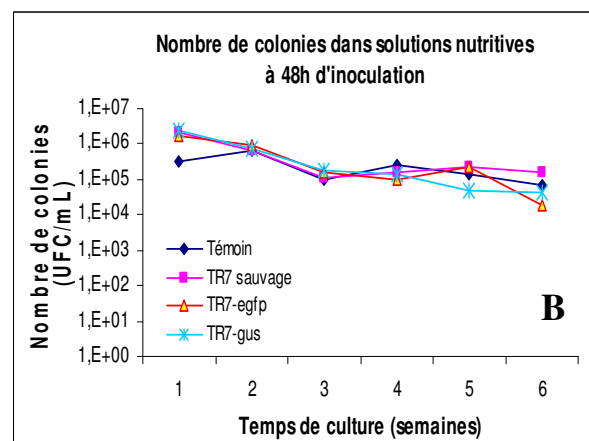
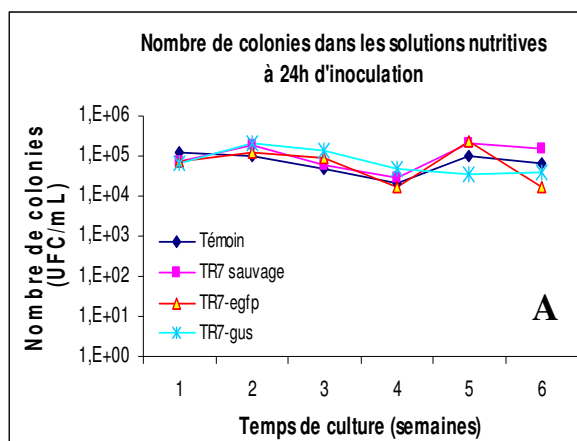


Figure 72: Quantité de microorganismes dans la solution nutritive de plantes hydroponiques cultivées avec ou sans (témoin) ajout initial d'*A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*). Le dénombrement des colonies formées sur boîtes de Pétri est effectué après 24h d'incubation (A) et 48h (B) pour visualiser les microorganismes à croissance rapide et ceux dont la croissance est plus lente (*i.e.* *A. rhizogenes* TR7).

III-3.4 Effet de la microflore de la solution nutritive sur la dégradation des alcaloïdes tropaniques

Dans le premier chapitre, nous avons montré que les microorganismes se développant dans les solutions nutritives étaient susceptibles de dégrader les alcaloïdes. Nous nous sommes demandé ici si l'ajout d'*Agrobacterium* pouvait avoir un effet positif ou négatif sur la demi-vie de H&S. Ainsi, à un instant t , nous avons prélevé de la solution nutritive, nous avons ajouté des alcaloïdes (#12mg/L) et l'ensemble a été incubé sous agitation à 25-26°C. Des prélèvements ont été effectués à 0 ; 5 ; 7 ; 24 ; 48 et 72h pour analyse par CLHP. Cette procédure a permis de déterminer la cinétique moyenne de dégradation de l'hyoscyamine (figure 73A) et de la scopolamine (figure 73B) pour toutes les modalités. Nous ne constatons pas de différence entre le témoin et les cultures inoculées. De même, aucune différence entre cultures inoculées ne peut être mise en évidence. Toutes les molécules ajoutées ont disparu en 48 heures d'incubation.

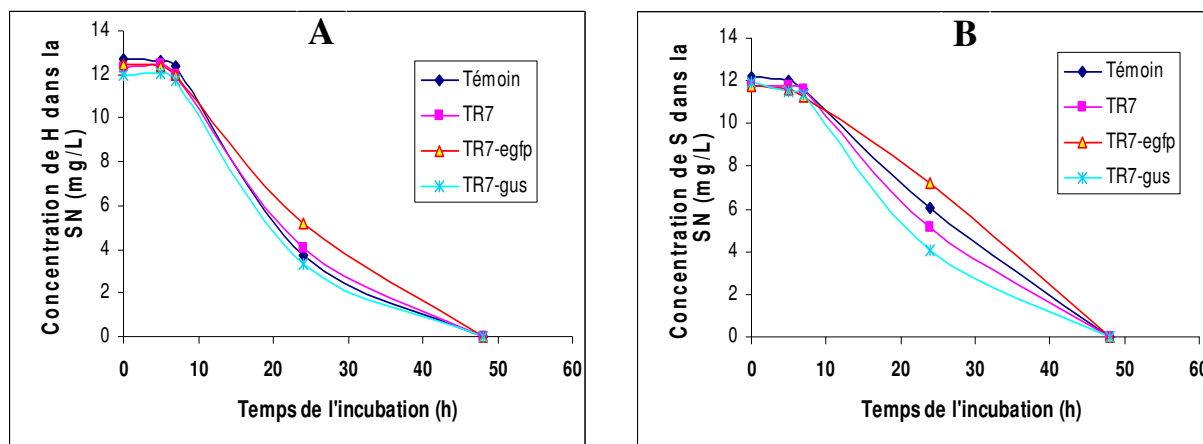


Figure 73: Cinétique moyenne de dégradation de l'hyoscyamine (A) et de la scopolamine (B) dans la solution nutritive de cultures hydroponiques de plantes réalisées avec ou sans apport de différentes souches d'agrobactéries [témoin versus *A. rhizogenes* TR7 (sauvage ou *egfp* ou *gus*)].

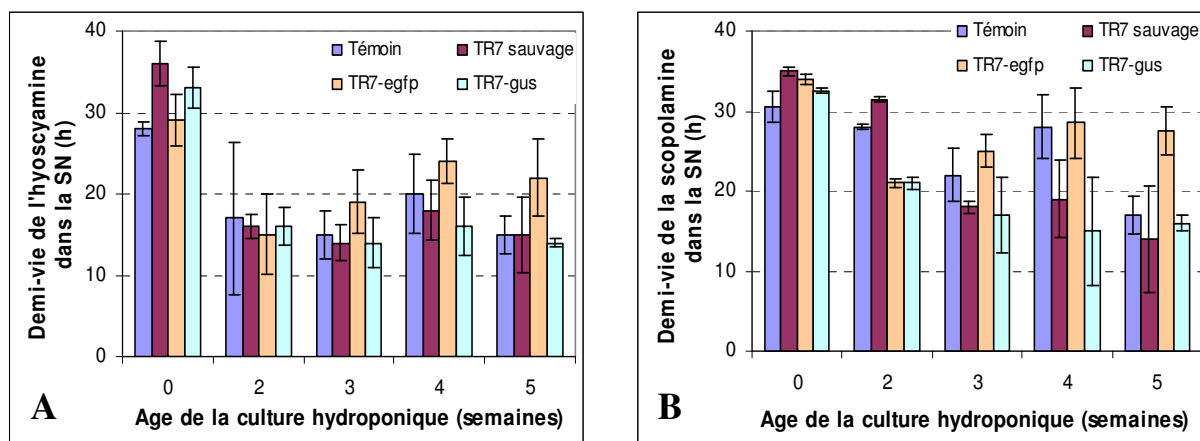


Figure 74: Temps de demi-vie moyenne de l'hyoscyamine (A) et de la scopolamine (B) dans la solution nutritive de cultures hydroponiques de plantes réalisées avec ou sans apport de différentes souches d'agrobactéries [témoin versus *A. rhizogenes* TR7 (sauvage ou *egfp* ou *gus*)].

Même si des variations apparaissent au cours du temps de culture en hydroponie, la demi-vie de la scopolamine (figure 74A) et de l'hyoscyamine (figure 74B) dans la solution nutritive n'excède pas 36 heures. Une tendance générale à la diminution peut être observée. Aucune différence significative ne peut être mise en évidence entre le témoin et les différentes modalités de traitement.

En conclusion, dans nos cultures hydroponiques, les alcaloïdes présents dans la solution nutritive sont dégradés très vite. L'apport d'agrobactéries :

- ✓ engendre des effets bénéfiques sur la croissance des plantes et l'accumulation de H&S dans les tissus ;
- ✓ n'accroît pas le phénomène de dégradation des alcaloïdes dans la solution nutritive.

Développement de cultures hydroponiques stériles pour l'étude de l'interaction plante-microorganismes.

Après avoir démontré *i)* le développement de populations microbiennes en cultures hydroponiques réalisées en serre, et, *ii)* la dégradation des alcaloïdes d'intérêt dans les solutions nutritives où se trouvent ces populations microbiennes, nous avons décidé de mettre en œuvre des cultures axéniques en vue de mieux cerner l'impact des microorganismes sur le système "Plantes à Traire".

III-4. Effets de la microflore dans la solution nutritive

Cette étude a pour objectif de comprendre le rôle des microorganismes se développant naturellement dans la solution nutritive des plantes hydroponiques et de déterminer leur influence sur l'accumulation de deux composés alcaloïdiques, H&S, dans les tissus végétaux.

Pour ce faire, des plantules issues de germinations stériles sur milieu gélosé ont été transplantées en hydroponie stérile. La solution nutritive d'une partie des plantes a été inoculée avec 3mL d'une solution nutritive provenant d'une culture hydroponique non stérile (culture de huit semaines réalisée en pilote non stérile en serre contenant 3.10^5 de UFC/mL de solution nutritive).



Planche 28 : Culture de *Datura innoxia* Mill. en hydroponie stérile après 4 semaines de culture.

L'expérimentation a été conduite en phytotron (planche 28) comme décrit dans la partie "matériels et méthodes". Une mesure de température a été effectuée dans le sac qui contient la partie aérienne et une autre mesure est faite dans la solution nutritive, une fois par jour, tout au long de l'expérimentation. Un décalage d'environ 1°C a été noté durant la période de culture ($T^{\circ}\text{air} > T^{\circ}\text{SN}$). Après quatre semaines de culture, nous avons récolté les plantes. Tout d'abord, la stérilité des racines de plantes sorties d'hydroponie a été contrôlée. Nous avons pu constater que 50% de plantes avaient subi une contamination accidentelle au cours de l'expérience.

III-4.1 Microflore et croissance des plantes

Une récolte unique après quatre semaines de culture est réalisée. Les résultats ont été traités selon trois modalités:

- ✓ culture stérile (témoin) ;

- ✓ non stérile (ensemencée par un inoculum microbien venant d'une culture non stérile en serre et contenant une relativement large diversité de microorganismes ayant déjà été en contact avec les racines de daturas) (planche 29b) ;
- ✓ culture contaminée (inoculée accidentellement lors de l'expérience et probablement colonisée par un faible nombre de genres et espèces de microorganisme) (planche 29a).

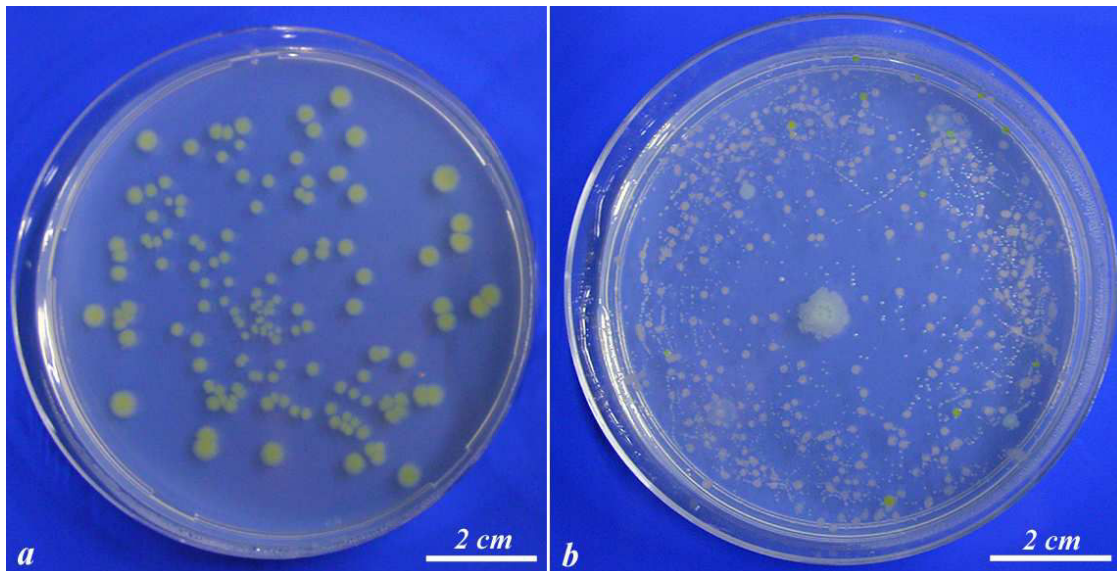


Planche 29: Populations microbiennes présentes dans la solution nutritive de cultures contaminées ponctuellement (a) et de cultures non-stériles (b). On constate une plus grande diversité des colonies microbiennes dans le second cas.

Aucun effet visible sur le nombre de feuilles, la hauteur des plantes et le diamètre des tiges des plantes n'a pu être mis en évidence (figures 75A-B). De même, la production de biomasse (MF et MS) a été mesurée. Au moment de la récolte, les plantes sont au stade "émergence du premier bouton floral" (BF: 2-3mm). Pour les trois modalités, nous avons obtenu une moyenne d'environ 12,5g de MF et 0,73g de MS par plante quelles que soient la modalité (figure 76). L'analyse statistique montre que la microflore dans la solution nutritive n'a pas d'effet significatif sur le rendement en biomasse totale de la plante, quelles que soient les modalités : culture stérile, non stérile ou contaminée.

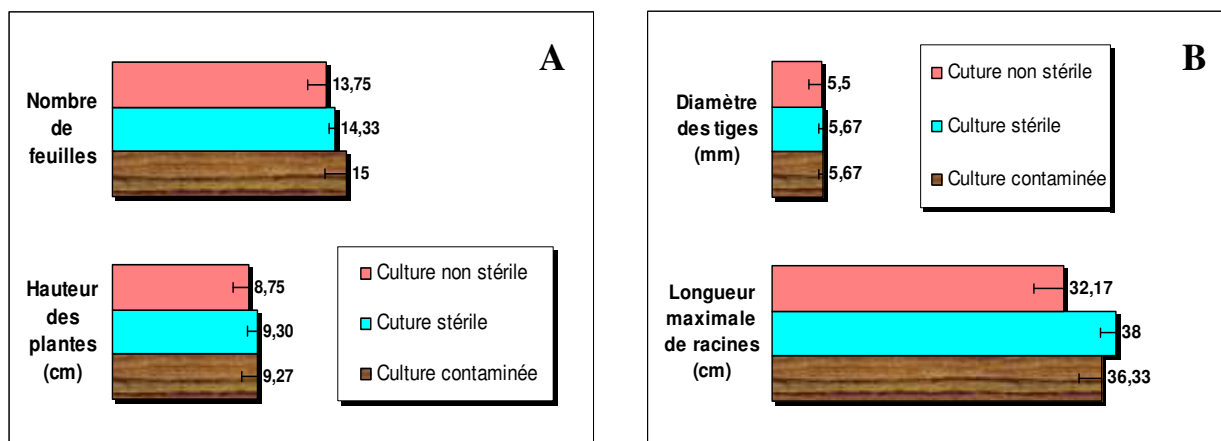


Figure 75: Hauteur et nombre de feuilles (A), diamètre des tiges et longueur maximale des racines (B) de plantes cultivées depuis 4 semaines en hydroponie stérile, non stérile ou stérile-contaminée.

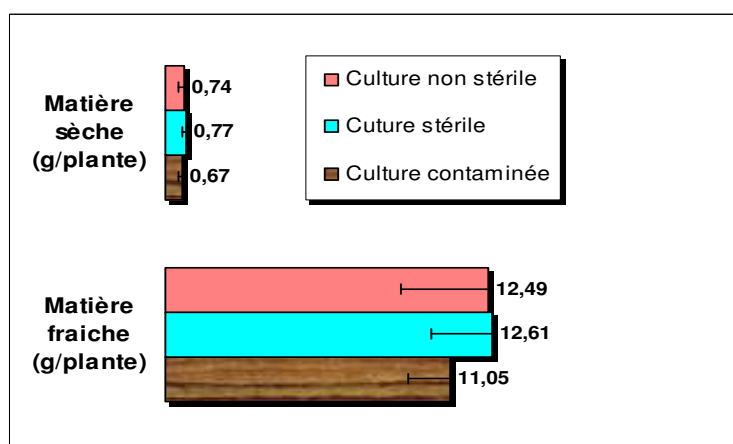


Figure 76: Masse fraîche et masse sèche de plantes cultivées depuis 4 semaines en hydroponie stérile, non stérile ou stérile-contaminée.

En revanche, les plantes cultivées en milieu stérile semblent avoir une croissance racinaire supérieure à celle des plantes non stériles (figure 75B). L'absence de microflore dans la solution nutritive a favorisé le développement des racines. Le rapport de la masse sèche des parties racinaires/parties aériennes est de 0,53 pour les cultures stériles et contaminées accidentellement et de 0,39 pour les cultures non stériles. L'asepsie de la solution nutritive affecte donc l'architecture de la plante au profit des parties racinaires. La présence d'une microflore diversifiée dans la solution nutritive a ici un rôle négatif sur le développement des parties racinaires.

L'observation des racines nous a permis de constater que chez les plantes non stériles (inoculées), le système racinaire est moins ramifié, moins allongé dans le milieu et les racines ont moins de poils absorbants que chez les autres plantes (stériles ou contaminées accidentellement) (planche 30). Au cours de la culture des plantes inoculées, une microflore est présente dans la solution nutritive et forme un bio-film autour des racines (planche 30b).

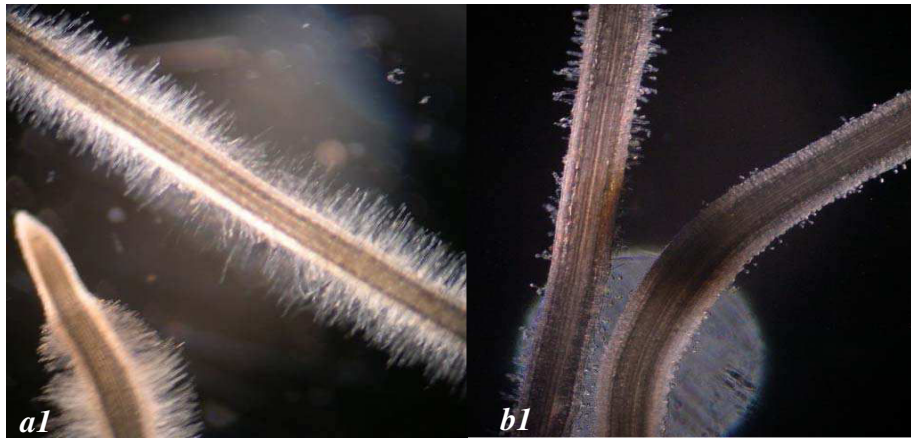
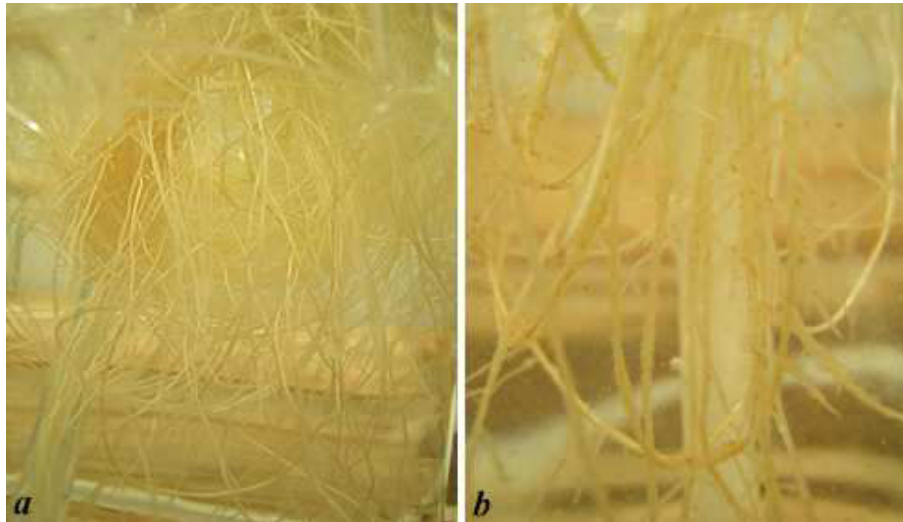


Planche 30: Racines de plantes cultivées en système hydroponique stérile depuis 4 semaines: (*a*, *a1*) racines stériles, (*b*, *b1*) racines d'une culture stérile ayant été inoculée avec une microflore issue de culture hydroponique non stérile en serre ; *a1* et *b1* sous la loupe binoculaire.

III-4.2 Microflore et accumulation d'alcaloïdes dans la plante

Chez le *Datura innoxia*, les divers organes n'accumulent pas strictement les mêmes formes d'alcaloïde. L'hyoscyamine est normalement produite et stockée de façon majoritaire dans les racines alors que les tiges feuillées accumulent essentiellement la scopolamine.

Pour dresser un bilan de répartition des alcaloïdes tropaniques, nous avons dosé H&S dans les divers organes récoltés. Selon les modalités de l'expérimentation, nous avons pu constater, après un mois de culture, que des proportions différentes d'alcaloïdes sont retrouvées dans les parties racinaires et aériennes (figure 77). Ainsi, pour l'hyoscyamine, l'accumulation se fait principalement dans les racines: 0,006, 0,044 et 0,015%MS, pour les cultures non stériles, stériles et contaminées respectivement. Les tiges feuillées en contiennent une très faible teneur (0,0004 ; 0,002 et 0,001% MS) (figure 77).

L'effet de la stérilité du milieu de culture se retrouve également pour l'accumulation de la scopolamine. Sa teneur est systématiquement plus faible dans tous les organes de la plante en cultures non stériles comparativement aux cultures stériles. Nous avons obtenu des teneurs moyennes de 0,063 et 0,082%MS, respectivement pour les parties racinaires et aériennes chez les plantes stériles, alors qu'elles n'étaient que de 0,014%MS dans les deux organes (tige feuillée et racine) des plantes non stériles inoculées. Pour les plantes contaminées accidentellement, les teneurs obtenues étaient respectivement, de 0,053 et 0,077%MS dans les parties racinaires et les parties aériennes (pas de différence significative entre plantes stériles et plantes contaminées accidentellement). La teneur en H&S dans les plantes stériles est quatre fois supérieure à celle mesurée dans les plantes non stériles et cette valeur est quasiment équivalente à celle mesurée dans les plantes contaminées accidentellement (figure 78).

Ces résultats nous amènent à émettre l'hypothèse suivante:

Les populations microbiennes présentes dans la solution nutritive dégradent les alcaloïdes libérés par les racines. Ceux-ci ne pouvant plus être réabsorbés par les tissus racinaires, la teneur en H&S dans la plante s'en trouve amoindrie.

Dans le cas d'une contamination accidentelle, celle-ci est probablement due à une ou quelques espèces microbiennes. Il ne s'agit alors pas de populations microbiennes déjà adaptées à la dégradation de H&S contrairement aux populations microbiennes issues de cultures pilotes en serre. La capacité de dégrader H&S dans la solution nutritive doit alors être

plus faible. La plante peut donc potentiellement réabsorber plus de H&S et alors, présenter peu de différences par rapport aux plantes stériles.

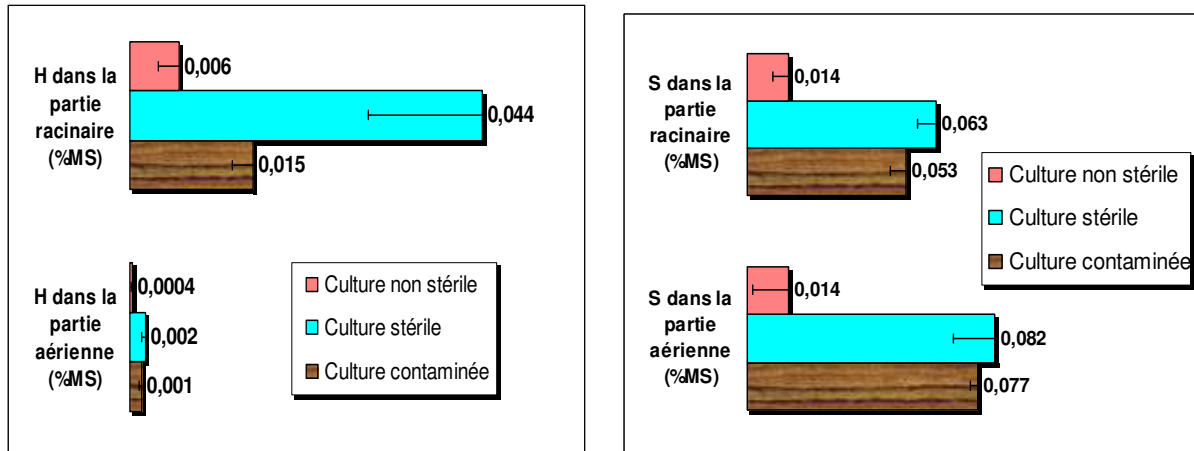


Figure 77 : Effet de la présence de microorganismes sur la teneur en hyoscyamine et scopolamine dans les parties aériennes et racinaires de plantes cultivées en hydroponie depuis 4 semaines de culture.

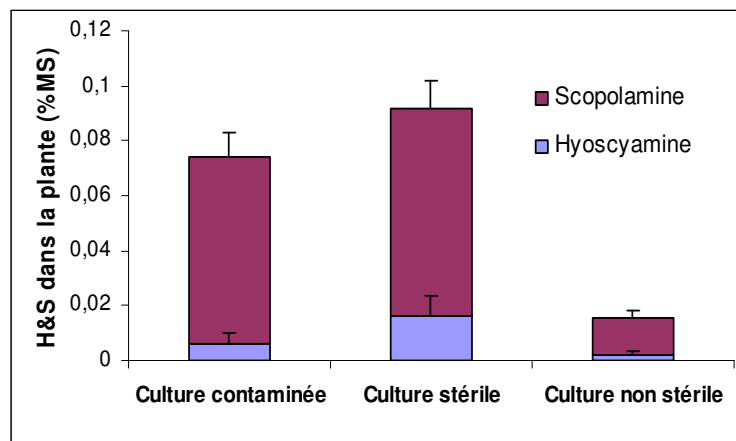


Figure 78: Teneurs moyennes en H&S dans les plantes cultivées en hydroponie depuis 4 semaines de culture.

III-4.3 Discussion et conclusion partielle

Ces résultats montrent clairement que la présence de microorganismes n'induit pas de différence significative en termes de production de biomasse, de nombre de feuilles et de hauteur des plantes. Elle a toutefois une influence sur le développement relatif des parties racinaires qui est plus faible chez les plantes non stériles.

La présence d'une microflore dans la solution nutritive engendre une diminution de la teneur en H&S dans la plante; c'est le cas lorsqu'il s'agit d'une population microbienne issue d'une culture hydroponique non stérile réalisée préalablement en serre. *A contrario*, une

microflore simple (microflore mono-spécifique ou à faible diversité issue d'une contamination accidentelle et ponctuelle) n'a pas d'effet significatif.

Ces résultats montrent que l'accumulation des alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* en hydroponie est influencée par la présence d'une microflore dans la solution nutritive. Au lieu de provoquer un éventuel effet éliciteur, la présence de microorganismes serait responsable d'une moindre accumulation des molécules recherchées dans la plante. Partant de cette hypothèse, il s'agira donc de tenter d'en expliquer les mécanismes.

III-5. Evaluation de la capacité d'absorption racinaire d'alcaloïdes présents dans la solution nutritive

Nous avons observé précédemment que les alcaloïdes étaient rapidement dégradés dans les solutions nutritives de culture hydroponiques en serre. Le chapitre précédent démontre que l'activité microbienne dans la solution nutritive peut avoir un effet négatif sur l'accumulation de H&S dans la plante hydroponique. Nous supposons donc que la plante libèrerait des alcaloïdes dans le milieu par diffusion simple et qu'elle présenterait une capacité à réabsorber ces composés de manière active ou facilitée. Pour conforter cette hypothèse, nous avons cherché à voir si des alcaloïdes ajoutés dans la solution nutritive stérile de plantes pouvaient être réabsorbés par les racines.

III-5.1 Evolution de la concentration de H&S dans la solution nutritive

Sur la base des résultats de Déchaux-Duval (2005), Tran (2005) et les résultats de Vu (2007), nous avons choisi de tester l'effet de l'absence de microflore sur l'évolution de la concentration de H&S ajoutées dans le milieu de cultures stériles au cours du temps afin de tenter de répondre à la double question suivante:

- Est-ce que l'hyoscyamine ou la scopolamine exogène apportée dans la solution nutritive peut être absorbé par les racines de la plante ?
- Si oui, quel est le devenir de la molécule ? En particulier, est-ce que l'une pourra être au moins partiellement convertie en l'autre ?

Pour ce faire, six plantes cultivées individuellement en hydroponie stérile dans des bouteilles d'un litre de solution nutritive ont été choisies pour le traitement réalisé pendant 24 heures en conditions aseptiques. Après cinq semaines de culture, les plantes sont au stade

émergence du premier bouton floral et les racines touchent le fond de la bouteille. Cent milligrammes d'hyoscyamine sont ajoutés dans la solution nutritive de trois plantes et la même quantité de scopolamine est utilisée pour trois autres plantes. Immédiatement après, l'évolution de la concentration de H&S dans la solution nutritive est mesurée par des prélèvements aseptiques de 1,5mL au cours du temps (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 et 24h). Les résultats sont présentés dans les figures 79a-b.

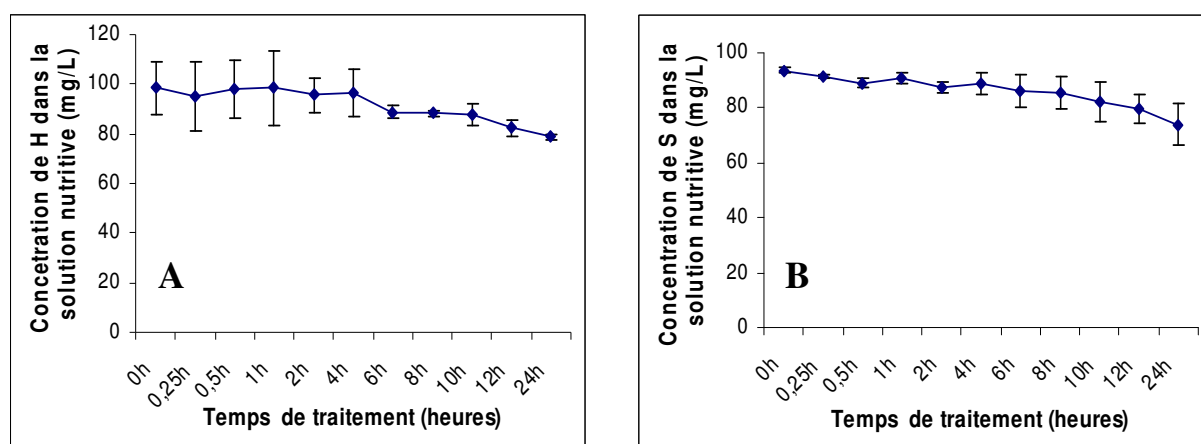


Figure 79: Evolution de la concentration en hyoscyamine (A) ou en scopolamine (B) ajoutées dans la solution nutritive stérile de plantes hydroponiques.

Nous observons une diminution légère de la concentration de H&S au cours du temps : une valeur moyenne de 19,4mg/L/culture pour l'hyoscyamine et 19,7mg/L/culture pour la scopolamine au bout de 24 heures. Les cinétiques ont le même profil (figure 79).

III-5.2 Accumulation de H&S dans la plante

Après 24 heures de traitement, les plantes ont été sacrifiées afin de doser les alcaloïdes dans la biomasse. On constate que l'ajout d'hyoscyamine ou de scopolamine a un effet positif sur l'accumulation de ces molécules dans la plante. Leur concentration (pour H et S respectivement) est 23,7 et 5,1 fois supérieure à celle mesurée dans trois plantes supplémentaires sacrifiées au départ (T0). En effet, la teneur dans les plantes à T0 était de 0,02 et 0,09%MS pour H et S, respectivement. Au bout de 24h de traitement, elle atteint 0,46%MS (figure 80). Cette augmentation pourrait être attribuée à un phénomène d'absorption par les plantes.

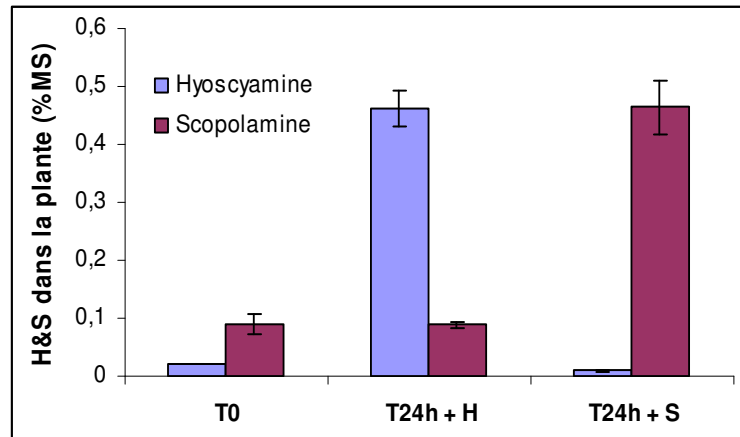


Figure 80: Concentration en H&S dans des plantes hydroponiques stériles, avant (T0), ou, 24H après ajout d'hyoscyamine (T24h+H) ou de scopolamine (T24h+S) dans la solution nutritive.

L'ajout d'hyoscyamine dans le milieu de culture n'a pas provoqué d'accumulation (*i.e.* de biotransformation) de scopolamine dans la plante. De même, l'apport de scopolamine exogène n'a pas eu d'effet sur l'accumulation d'hyoscyamine dans la plante (figures 80-81).

Après 24 heures de contact avec l'hyoscyamine ou la scopolamine, la concentration en ces molécules dans la plante a été augmentée de 23,7 et 5,1 fois respectivement (par rapport au témoin). L'accumulation de ces deux molécules atteint une valeur moyenne de 0,22mg/g de matière fraîche de plante (figure 81A), soit environ 16 mg d'hyoscyamine et 17 mg de scopolamine par plante (figure 81B).

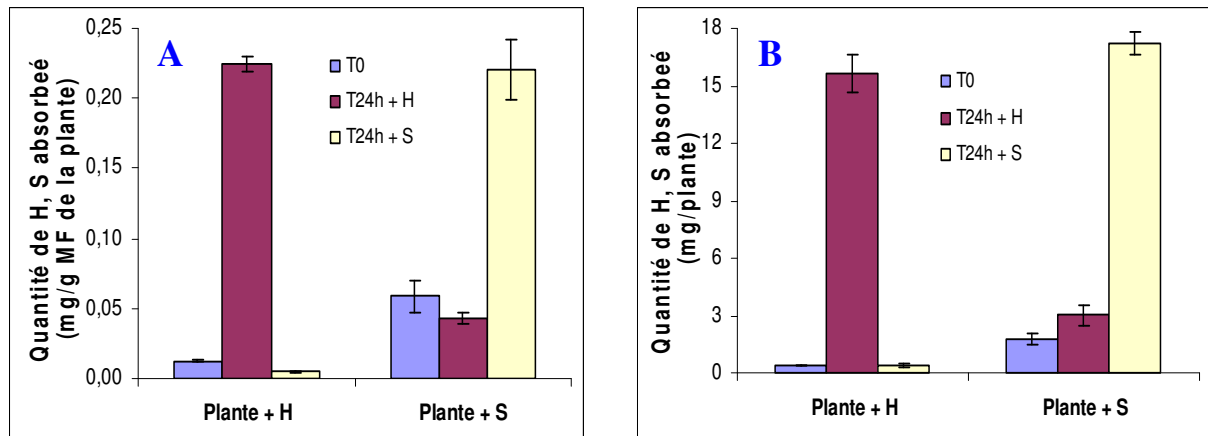


Figure 81 : Quantité de H&S dans des plantes hydroponiques stériles avant (T0) ou 24h après d'addition de 100mg/L d'hyoscyamine (T24h+H) ou de scopolamine (T24h+S). (A) quantité exprimée en mg/g de matière fraîche et (B) en mg/plante.

mg/gMF vs mg/mL

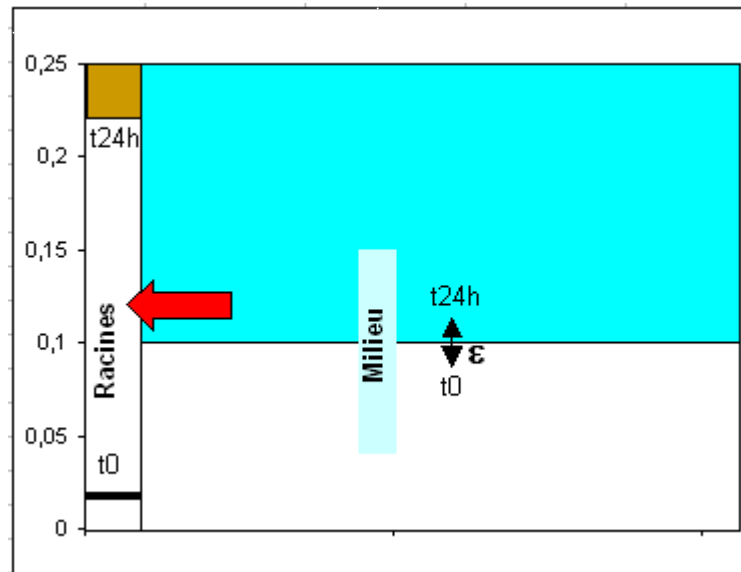


Planche 31: Schéma de répartition de la concentration en hyoscyamine (masse par unité de volume: mg/ml) entre le "compartiment solution nutritive" (milieu) et le "compartiment racinaire" (racines) à 24h après ajout de 100mg/L de H dans le milieu.

Sur la base des figures précédentes, en particulier en comparant les valeurs exprimées en mg/g MF (pour la concentration dans la biomasse; densité#1) et en mg/ml (pour la concentration dans le milieu; densité#1), on constate qu'il y a absorption apparente de l'hyoscyamine dans les tissus racinaires où la concentration moyenne est plus de deux fois supérieure à la concentration dans le milieu (planche 31). Il semble donc exister soit une différence de solubilité, soit, plus vraisemblablement, un transport actif ou facilité qui conduit à un véritable "pompage" de l'hyoscyamine contenue dans le milieu.

Il en est de même pour la scopolamine.

III-5.3 Discussion et conclusion partielle

Nous avons montré que, dans les solutions non stériles telles que celles obtenues en serre, des populations microbiennes pouvaient s'installer. Parmi ces microorganismes, au moins une partie est apte à dégrader les alcaloïdes auxquels ils se trouvent exposés. La présence des tels microorganismes engendre une diminution de la quantité totale d'alcaloïdes dans les plantes. Par ailleurs, nous avons observé que les plantes absorbent les alcaloïdes ajoutés dans les solutions nutritives.

On peut donc imaginer un schéma conceptuel selon lequel, une partie des molécules synthétisées dans la plante se retrouvent libérés (probablement par diffusion passive) dans la solution nutritive (planche 32). En conditions non stériles, les microorganismes sont capables de dégrader au moins une partie de ces composés qui ne sont alors plus disponibles pour être

réabsorbés par les racines. Au final, la plante ainsi cultivée présenterait des concentrations en H&S amoindries par rapport à son potentiel génétique et à sa biosynthèse totale réelle.

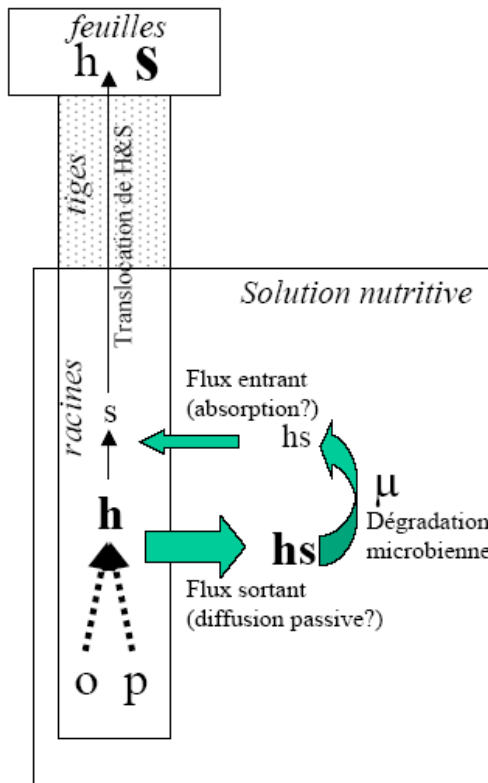


Planche 32: Schéma récapitulatif décrivant l'hypothèse de fonctionnement des daturas en culture hydroponique non stérile. L'hyoscyamine (H) et la scopolamine (S) sont successivement synthétisées dans les racines à partir d'ornithine (O) et phénylalanine ou d'acide phényllactique (P). Une partie de H&S est libérée dans la solution nutritive par diffusion passive. Les microorganismes présents dans la solution nutritive dégradent une partie des alcaloïdes ce qui amoindrit la réabsorption active ou facilité. Une partie des alcaloïdes synthétisés dans les racines est transportée et accumulée dans les parties aériennes. Au cours de cette translocation, la conversion de l'hyoscyamine en scopolamine est poursuivie et, au final, le ratio S/H des feuilles est supérieur à celui des racines.

III-6. Effet de l'inoculation par *Agrobacterium rhizogenes*

III-6.1 Effet combiné d'*Agrobacterium rhizogenes* et d'une microflore diversifiée

Dans les conditions hydroponiques de serre, nous avons vu que *A. rhizogenes* avait une influence positive sur la croissance et la production de métabolites secondaires. Sur la base des résultats obtenus avec les populations microbiennes issues de cultures pilotes, nous voulions tester l'effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et d'une microflore issue de pilote hydroponiques en serre. L'expérience a été effectuée dans une chambre de culture, sous éclairage artificiel pendant une photopériode de 16 heures à une température de 25-26°C. Quatre modalités ont été établies comme indiqué ci-dessous :

1. Cultures stériles : *sté* ;
2. Cultures stériles inoculées avec *A. rhizogenes* 11325 : *stéAr* ;
3. Cultures non stériles inoculées avec 11325 (culture stérile en bouteille avec couverture en plastique, dans laquelle **a-** on a ajouté 10ml de solution nutritive non stérile venant

d'une culture hydroponique en serre et **b-** qu'on a inoculée avec *A. rhizogenes* 11325): *nonstéAr* ;

4. Cultures non stériles (culture stérile en bouteille avec couverture en plastique, dans laquelle on a ajouté 10mL de solution nutritive non stérile venant d'une culture hydroponique en serre): *nonsté*.

III-6.1.1 Croissance végétative et production de biomasse

Après 4 semaines de culture, la hauteur des plantes et le nombre de feuilles ne sont pas différents quelle que soit la modalité (figures 82A-B). Le diamètre des tiges et la surface foliaire (figures 83A-B) apparaissent moindres chez les plantes stériles avec ou sans *A. rhizogenes* (soit *stér* et *stéAr*) que chez les plantes non stériles (*nonstéAr* et *nonsté*).

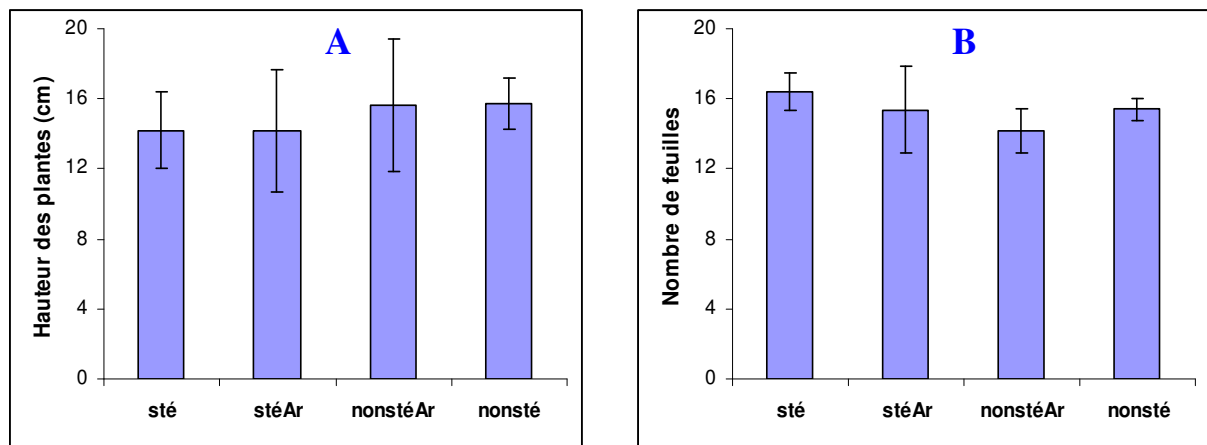


Figure 82 : Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur la hauteur (A) et le nombre de feuilles (B) de la plante hydroponiques; (sté) plantes stériles; (stéAr) plantes stériles co-cultivées avec *A. rhizogenes*; (nonstéAr) plantes stériles recontaminées avec les microorganismes d'une culture hydroponique non-stérile issue de serre et co-cultivées avec *A. rhizogenes* (nonsté) plantes stériles cultivées en présences de microorganismes provenant d'une culture hydroponique non-stérile issue de serre.

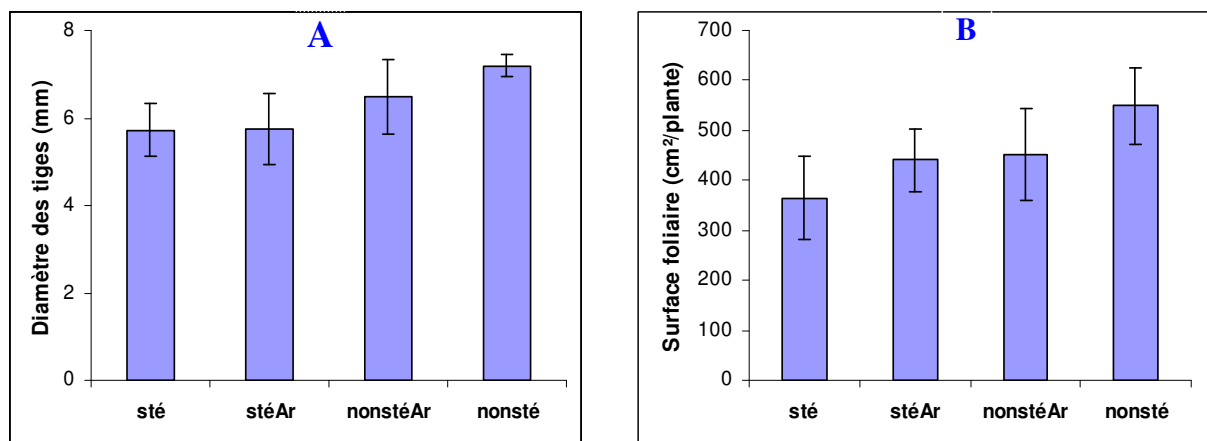
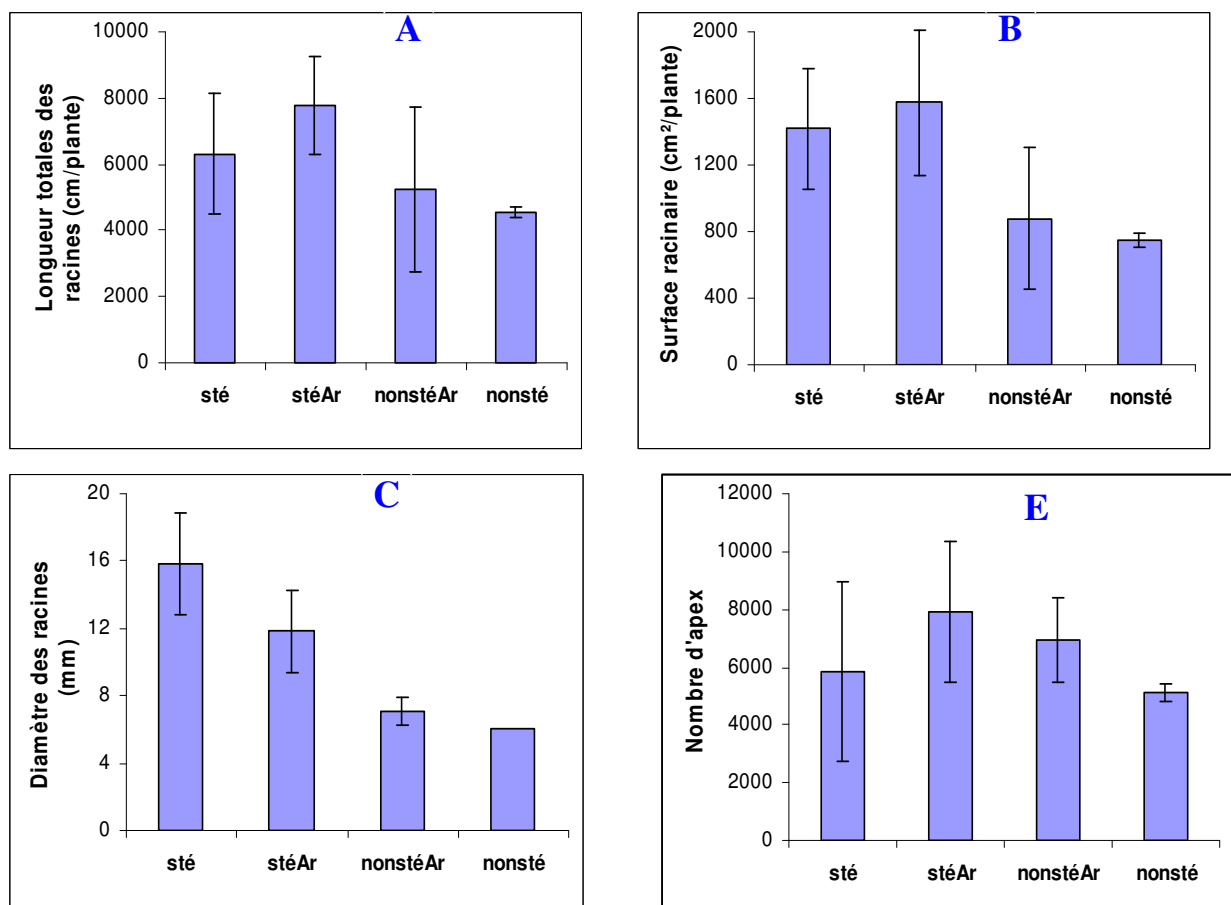


Figure 83: Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur les paramètres de croissance racinaire de plantes hydroponiques soit (A) diamètre des tiges et (B) surface foliaire.

Les plantes cultivées en milieu stérile semblent présenter une croissance racinaire supérieure à celle des plantes non stériles (figures 84A-F). En effet, comparativement aux plantes non stériles (*nonstéAr* et *nonsté*), les plantes *sté* et *stéAr* donnent les meilleurs résultats en termes de longueur, de surface, de diamètre et de volume des racines. L'absence de microflore naturelle dans la solution nutritive a favorisé le développement des racines. La stérilité de la solution nutritive affecte donc l'architecture de la plante au profit des parties racinaires. Ici encore, nous confirmons que la présence d'une microflore dans la solution nutritive joue un rôle négatif sur le développement des parties racinaires.

Le résultat d'analyse WinRhizo montre également que *A. rhizogenes* 11325 a un effet sur la morphologie racinaire. Cette souche stimule le développement du nombre d'apex (X 1,35) et la ramification des racines (X 1,3).



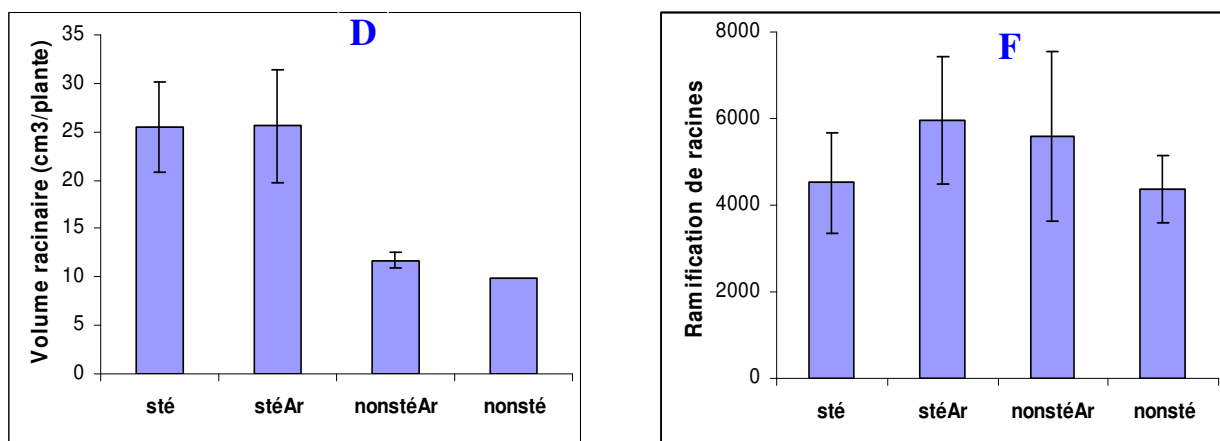


Figure 84 : Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur les paramètres de croissance racinaires des plantes hydroponiques.

La biomasse fraîche et sèche des plantes cultivées sous les différentes modalités suit la même tendance que les paramètres de croissance aérienne. Au bout de 4 semaines, les plantes ont atteint des valeurs moyennes de 29-30 g de MF/plante, soit 2,4-2,5 g de MS/plante (figure 85). Dans ces conditions expérimentales, on note que l'infection bactérienne par *A. rhizogenes* n'a pas d'effet significatif sur l'augmentation de la biomasse fraîche et sèche des plantes. L'inoculation de populations microbiennes issues des cultures hydroponiques pilotes tend à favoriser la biomasse des parties aériennes.

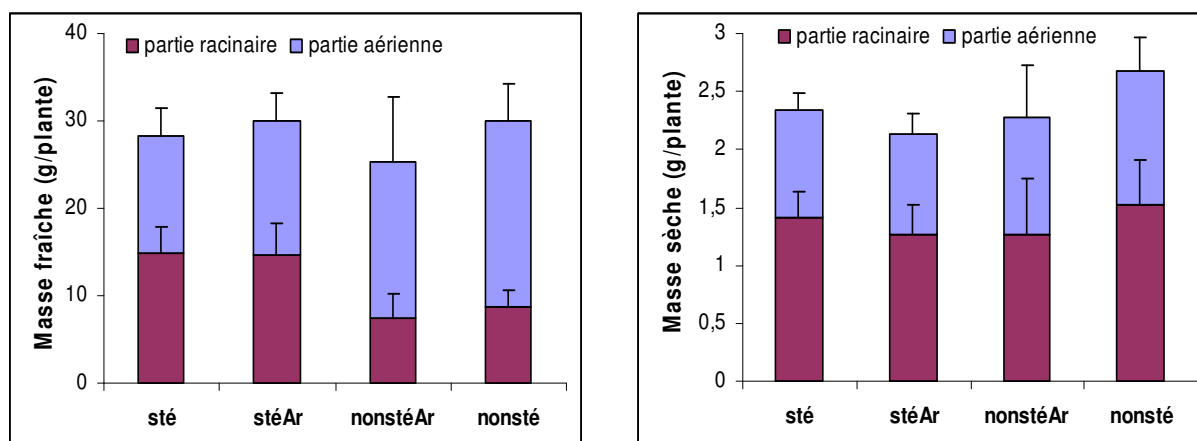


Figure 85 : Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur la biomasse des plantes hydroponiques.

III-6.1.2 Production de métabolites secondaires

Après 4 semaines de culture, l'analyse du contenu en H&S des matières sèches montre que les plantes stériles (*sté* et *stéAr*) contiennent plus de H&S que les plantes non stériles (*nonstéAr* et *nonsté*) (figures 86A-B). La différence entre les deux groupes est statistiquement

significative. La teneur en H&S est trois fois plus élevée dans les organes des plantes stériles que dans ceux des plantes non stériles. Par rapport aux plantes stériles, les plantes stériles inoculées avec *A. rhizogenes* 11325 donnent le meilleur résultat. En effet, la quantité de H&S produite chez ces plantes est d'environ 2 mg/plante, alors que cette valeur n'est que de 1 mg/plante chez les plantes stériles, et de 0,3 et 0,6 mg/plante pour les plantes non stériles : *nonstéAr* et *nonsté*, respectivement (figure 87).

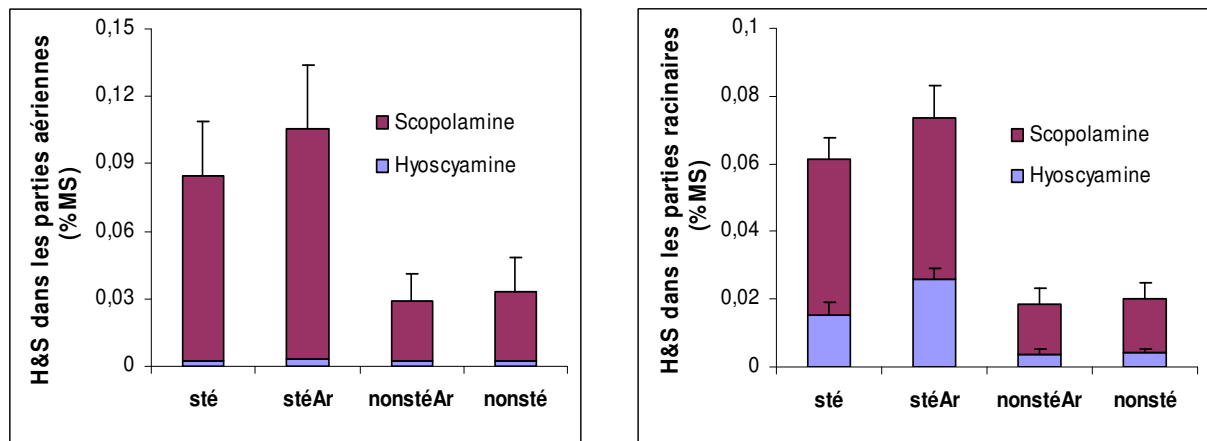


Figure 86: Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur l'accumulation de H&S dans les organes de la plante.

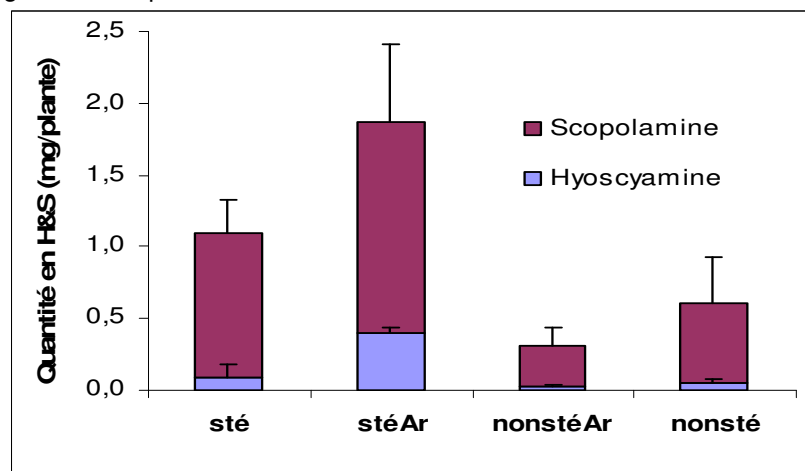


Figure 87: Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur la production de H&S dans les organes de la plante.

En conclusion, l'inoculation à l'aide d'*A. rhizogenes* 11325 a induit une amélioration de la croissance et de l'accumulation des alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia*. L'apport de microorganismes issus de cultures en serre a limité la croissance relative des racines ainsi que la teneur en métabolites dans la biomasse. Comparativement aux expérimentations conduites en serre, les effets semblent moins importants ici, en condition de culture stériles et avec la souche *Ar11325* (utilisée ici pour des raisons techniques). Aussi, nous avons décidé de

re-tester l'effet de la souche TR7 tout en évaluant l'effet potentiel d'un ajout d'acétylsyringone* dans la solution nutritive des plantes.

(*composé décrit comme activateur de la virulence des agrobactéries).



Planche 33: Feuilles, parties aériennes et racines de plantes hydroponique stériles témoin (a) et inoculées avec *A. rhizogenes* (b), cultivées depuis 6 semaines.

On constate des différences visibles entre les plantes stériles et celles qui ont été mises en contact avec *Agrobacterium*. Par rapport aux témoins, les parties aériennes de ces dernières ont une morphologie plus compacte, les systèmes racinaires sont plus denses et la coloration des feuilles présente des zones de ponctuation ou de décoloration (planche 33).

III-6.2 Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de l'acétylsyringone utilisée comme activateur de virulence

Ayant observé que l'apport de la souche 11325 n'améliorait que modérément la croissance et l'accumulation d'alcaloïdes dans les tissus végétaux, nous avons mis en place le dispositif expérimental suivant regroupant 4 modalités de culture individuelle stérile :

- ✓ modalité 1 : témoin ;

- ✓ modalité 2 : inoculation avec TR7 (8.10^9 UFC/mL) ;
- ✓ modalité 3 : témoin avec ajout de $50\mu\text{M}$ d'acétosyringone (As) ;
- ✓ modalité 4 : inoculation avec TR7 (8.10^9 UFC/mL) et ajout As ($50\mu\text{M}$).

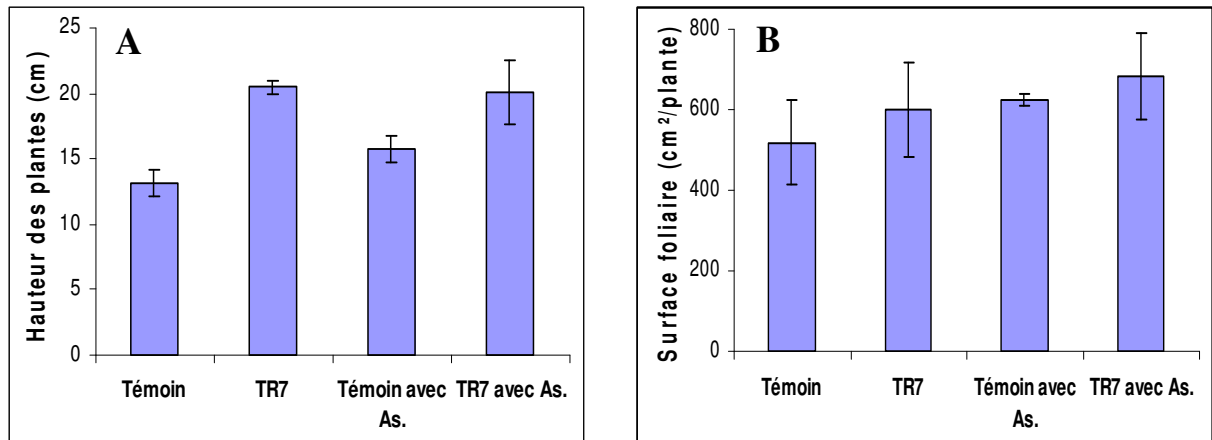


Figure 88: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de $50\mu\text{M}$ d'acétosyringone sur la hauteur (A) et la surface foliaire (B) des plantes.

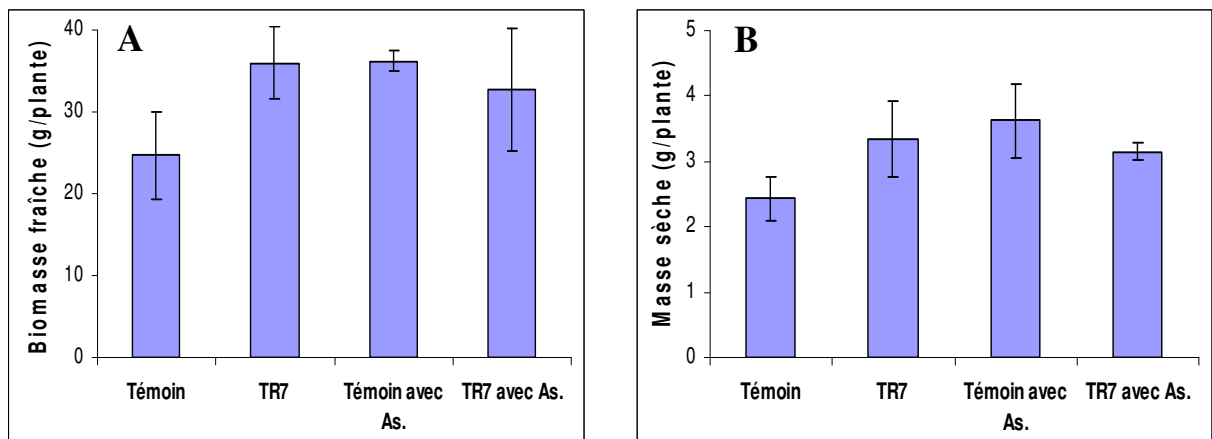


Figure 89: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de $50\mu\text{M}$ d'acétosyringone sur la biomasse des plantes: (A) biomasse fraîche; (B) matière sèche.

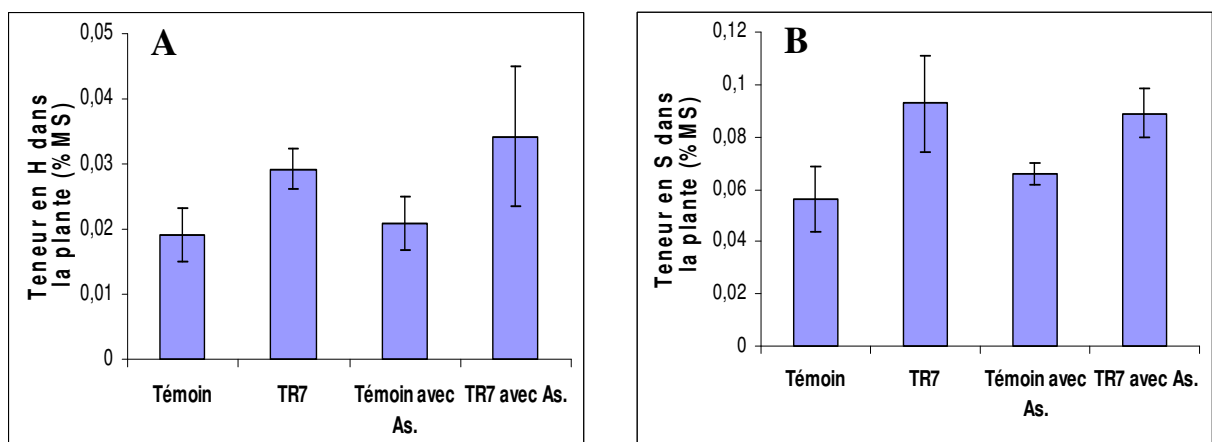


Figure 90: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de $50\mu\text{M}$ d'acétosyringone sur la teneur en hyoscyamine (A) et en scopolamine (B) dans les organes de la plante.

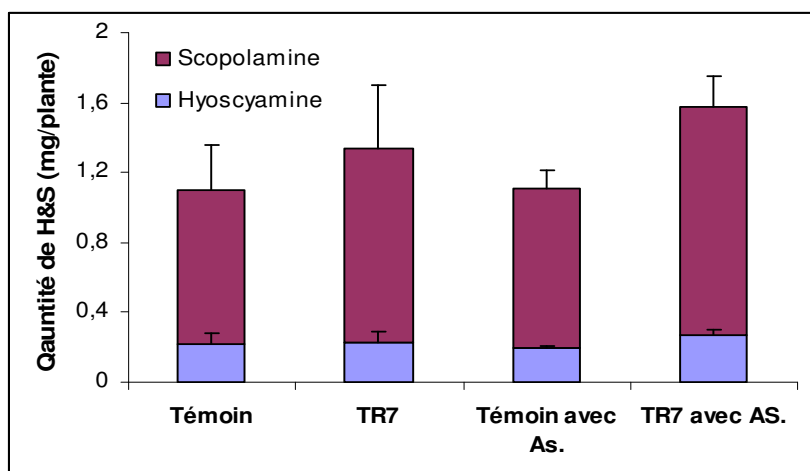


Figure 91: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de 50µM d'acétosyringone sur la quantité de H&S accumulée dans les organes de la plante.

L'ensemble des résultats obtenus montre que *ArTR7* favorise la croissance en hauteur des plantes (figure 88A), le développement de leur surface foliaire (figure 88B) et ainsi, la production de biomasse (figures 89A-B). La teneur en H&S est augmentée, ce qui conduit à terme une amélioration de la quantité totale d'alcaloïdes dans la plante (figures 90A-B). On constate cependant que comme avec la souche 11325, le gain de production est plus limité dans ce dispositif permettant la culture stérile comparativement aux conditions de culture hydroponique en serre. L'ajout de 50µM d'acétosyringone a un effet direct sur la croissance mais n'amplifie pas la réponse obtenue en présence d'agrobactéries (figure 91).





On peut donc conclure que, si notre dispositif hydroponique stérile permet d'accéder à certaines informations, il engendre aussi un biais dans la réponse des plantes. Ceci est probablement dû au microclimat (très forte hygrométrie) régnant sous le sac en polyéthylène utilisé pour maintenir la stérilité des parties aériennes. En tout état de cause, les réponses vont dans le même sens que dans les expériences conduites en serre. L'acétosyringone n'augmente pas les effets d'*Agrobacterium* dans cette expérimentation.

III-7. Détermination des modalités d'action d'*Agrobacterium* par analyse des racines obtenues après co-culture plantes-bactéries en conditions axéniques

Après avoir démontré les effets positifs d'*Agrobacterium*, cette dernière partie de notre travail a pour but d'expliciter les mécanismes mis en jeu; c'est-à-dire de déterminer que les effets observés suite à la co-culture datura-agrobactéries sont liés à l'occurrence d'évènements de transformation génétique.

III-7.1 Co-cultures axéniques *Datura-Agrobacterium*

Pour démontrer que la co-culture daturas-agrobactéries induit une transformation génétique, nous avons spécifiquement mis en œuvre des cultures hydroponiques stériles de daturas. Ainsi, quatre modalités ont été établies:

-  Cultures stériles : témoin sans traitement ;
-  Cultures stériles inoculées avec *A. rhizogenes* TR7 sauvage ;
-  Cultures stériles inoculées avec *A. rhizogenes* TR7-*egfp* ;
-  Cultures stériles *A. rhizogenes* TR7-*gus*.

Pour chaque souche utilisée, nous avons travaillé sur 9 plantules (*vitroplants*) de daturas provenant de germination *in vitro* sur milieu gélosé. Lorsque les plantules stériles sont âgées d'environ 8 semaines et avec 4 feuilles vraies, une transplantation en hydroponie stérile est réalisée. La solution nutritive est infectée par l'ajout d'*A. rhizogenes* pré-cultivées dans le milieu YMB liquide pendant 20-24 heures (DO_{600nm} de 1,5-1,6). Ce dernier est enlevé par centrifugation avant de ressuspendre le culot avec le même volume de solution nutritive. L'inoculum est ajouté directement dans le milieu de culture. Pour chaque souche, trois concentrations bactériennes différentes sont appliquées à raison de 3 plantes par souche (0,5mL, 1mL ou 2mL de suspensions bactériennes). Chaque culture correspond à une des concentrations bactériennes finales de $0,15 \cdot 10^5$; $0,31 \cdot 10^5$ et $0,62 \cdot 10^5$ UFC/mL pour les milieux infectés par *A. rhizogenes* TR7 sauvage $0,17 \cdot 10^5$; $0,34 \cdot 10^5$ et $0,68 \cdot 10^5$ UFC/mL pour les milieux infectés avec *A. rhizogenes* TR7-*egfp* et $0,16 \cdot 10^5$; $0,33 \cdot 10^5$ et $0,66 \cdot 10^5$ UFC/mL pour les milieux infectés avec *A. rhizogenes* TR7-*gus*).

Ensuite, 50 μ M d'acétosyringone (9,81mg) sont ajoutés dans les milieux nutritifs. L'ensemble des cultures est placé dans une chambre sous éclairage artificiel (photopériode 16h ; température

25-26°C; voir planche 34). Une récolte unique est réalisée au bout de 25 jours. Les racines obtenues, au bout de 25 jours de culture, sont présentées dans la planche 35(a-d).



Planche 34 : Dispositif de culture hydroponique stérile utilisé pour tester l'effet d'*Agrobacterium*
(vue au 10^{ème} jour de culture)

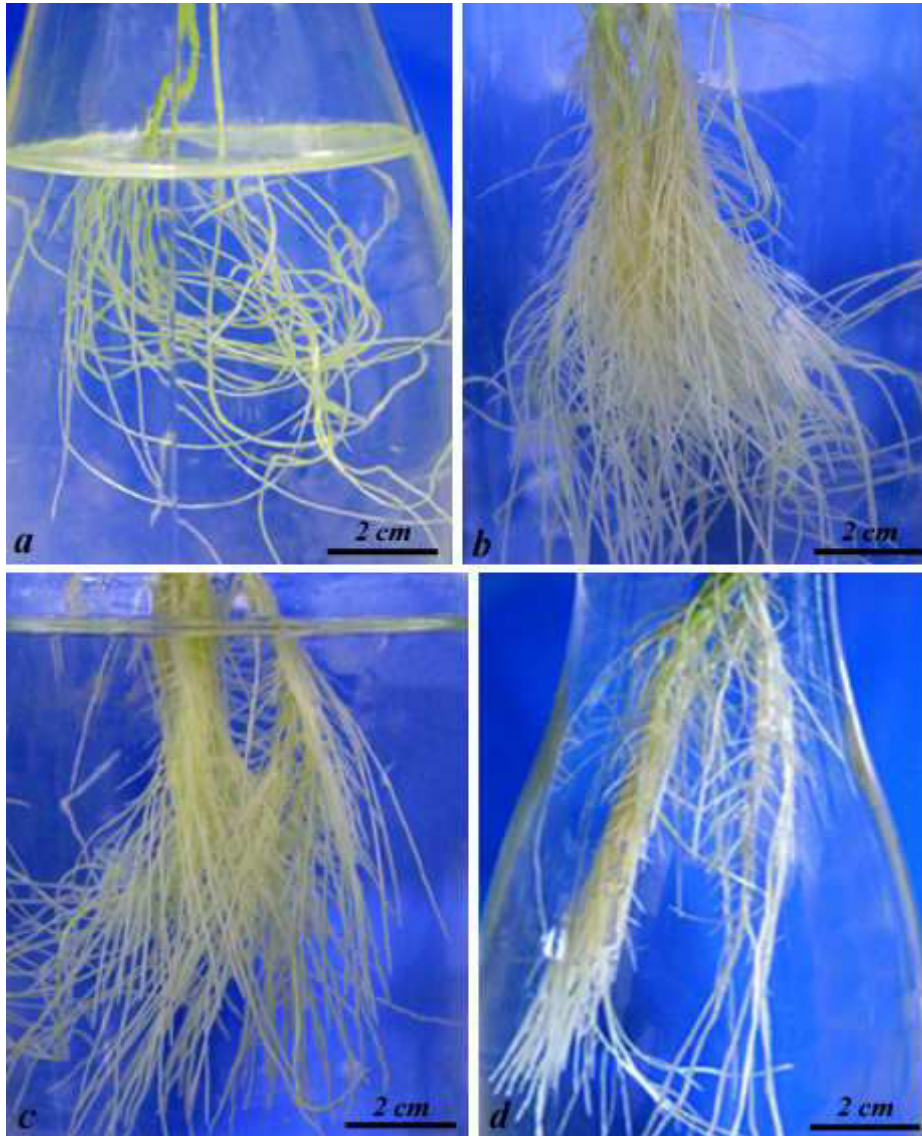


Planche 35: Systèmes racinaires de *Datura innoxia* cultivés en hydroponie stérile et inoculés par *A. rhizogenes*; (a) racines témoins, (b) racines infectées avec la souche TR7 sauvage, (c) racines infectées avec TR7-*egfp* et (d) racines infectées avec TR7-*gus* après 25 jours de culture.

III-7.2 Etude de l'expression des gènes rapporteurs

Le gène rapporteur *egfp* codant la protéine fluorescente verte (EGFP : protéine verte fluorescente modifiée a été employé comme marqueur visuel de transformation. Dans notre cas, ce gène a été utilisé avec pour objectif une détection précoce de l'état transgénique de nos racines pour le gène *egfp*. Les analyses en microscopie, réalisées sur des racines de plantes hydroponiques infectées par *A. rhizogenes* TR7-*egfp*, ont montré la présence d'une fluorescence au niveau des parois et des noyaux des cellules racinaires (planche 36c-d). On peut donc affirmer l'existence de la protéine EGFP dans ces racines. Elle est absente chez les témoins et les racines issues de la co-culture avec *Ar*TR7 (type sauvage) et *Ar*TR7-*gus*.

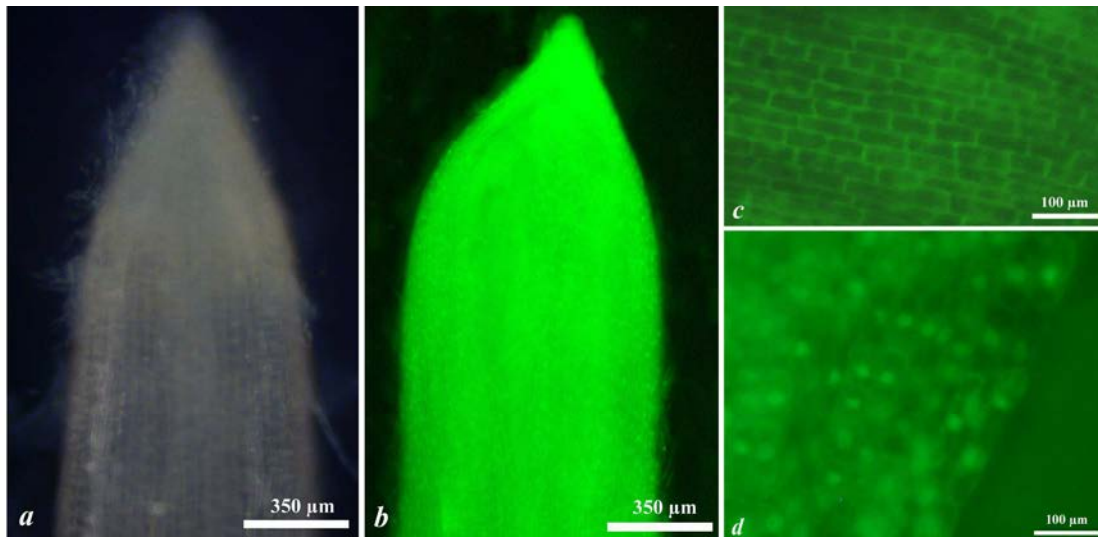


Planche 36 : Racines de *D. innoxia* observées sous microscope à fluorescence avec le filtre GFP (excitation à 488nm): (a) racine contrôle, (b) racine présentant une fluorescence verte due à la présence de EGFP (racine putativement transformée), (c) et (d) localisation cellulaire de la fluorescence vue à plus fort grossissement.

Au total, les 7 plantes ayant été co-cultivées avec *ArTR7-egfp* ont toutes donné des racines parmi lesquelles certaines présentaient une fluorescence révélant EGFP.

Parallèlement, nous avons mis en œuvre la méthode histochimique utilisant le substrat X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique) pour mettre en évidence la présence d'une activité β -glucuronidase et donc l'expression du gène rapporteur *gus* dans les tissus racinaires issues de plantes co-cultivées avec *ArTR7-gus* (planche 37). Ces racines ont été prélevées puis incubées en présence de X-gluc (concentration de X-gluc : 0,5mg/mL, taille des racines : 0,7-1mm, volume du milieu réactionnel : 50mL pour 2,5gMF) pendant 24 heures à 37°C. Afin de mieux visualiser la coloration bleue, les éventuelles chlorophylles (verdissement des racines) ont été éliminées par un bain d'éthanol à 70° comme indiqué dans la partie « matériels et méthodes ». Un témoin négatif est réalisé grâce à des racines d'une plante non infectée.

Les résultats que nous avons obtenus (décrits sur la planche 37) indiquent une coloration bleue ponctuelle des racines transformées par *A. rhizogenes* TR7-*gus*. Cette coloration, bien que non homogène sur l'ensemble de la racine, témoigne de la présence de β -glucuronidase chez 7 plantes ayant été co-cultivées avec *ArTR7-gus* et plaide en faveur d'évènement de transformation au cours de la croissance des racines. La coloration non homogène de l'ensemble des racines pourrait s'expliquer de diverses manières : 1) racines chimériques présentant un mélange de racines n'ayant pas intégré le T-DNA portant le gène

GUS (racines sauvages ou racines uniquement transformées par le T-DNA du plasmide Ri) ;
2) problème d'infiltration du substrat dans les racines ; 3) présence de bactéries contaminantes dans le milieu de culture (exclu selon les tests que nous avons réalisés).

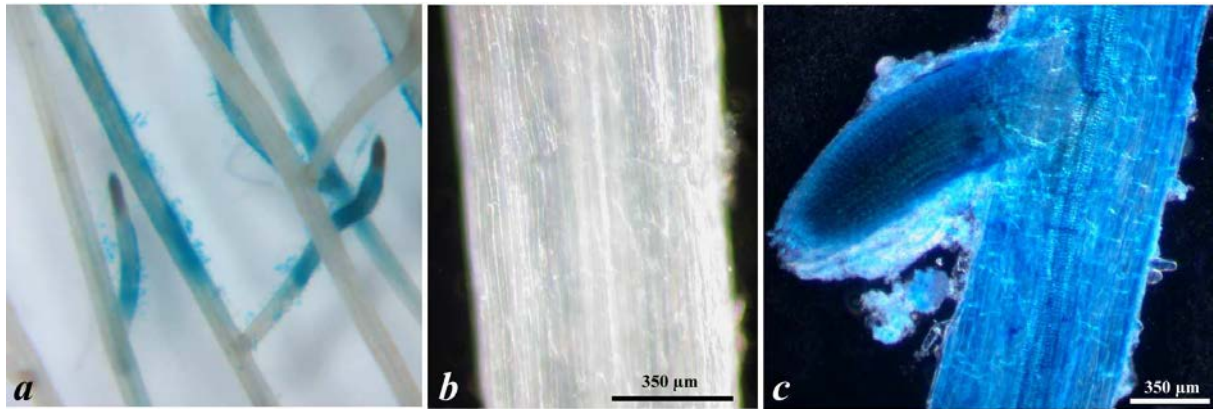


Planche 37: Racines de *D. innoxia* présentant une couleur bleue due à la métabolisation de X-Gluc par l'enzyme β -glucuronidase (racines potentiellement transformées): (a) racines issues de culture hydroponique conduite en présence de *ArTR7-gus* révélant un phénotype chimérique visible à la loupe binoculaire ; (b) racine témoin non transformée et (c) racine potentiellement transformée par le gène *gus*, incubé en présence du substrat X-Gluc et observée sous microscope.

III-7.3 Isolement de racines et réalisation de tests en culture *in vitro*

En vue de déterminer s'il y aurait une transformation génétique ou non - et donc insertion et expression des oncogènes d'*Agrobacterium* - nous avons isolé des pointes racinaires issues des plantes stériles inoculées ou non (témoins). Après avoir été soigneusement rincées en vue d'éliminer les bactéries, ces racines ont été placées sur milieu gélosé (milieu solide MS/2-30 + céfotaxime 300mg/L) en boîtes de Pétri (planche 38a-d). L'utilisation de ce bactériostatique durant 7 repiquages a été faite pour tenter d'éliminer les dernières bactéries sur les racines. Au cours du temps, nous avons observé ces cultures pour déterminer la proportion de racines se développant sur la gélose (planche 38e-h).



Planche 38 : Observation de racines issues de plantes cultivées en conditions hydroponiques sur milieu sélectif solide (MS/2-30) additionné de céfotaxime (300mg/L) et dépourvu phytohormone.

(a) : racines témoins ; (b), (c) et (d) : racines inoculées avec *A. rhizogenes* TR7 sauvage, *A. rhizogenes* TR7-*egfp* et *A. rhizogenes* TR7-*gus* à t0 ; (e) : racines témoins à t8 jours; (f), (g) et (h) : racines inoculées avec *A. rhizogenes* TR7 sauvage, *A. rhizogenes* TR7-*egfp* et *A. rhizogenes* TR7-*gus* à t8 jours.

Comme on peut le constater sur la planche 38e, aucun explant racinaire n'a pu se développer sous forme de chevelu racinaire chez les plantes témoins. La plupart des cultures ont fini par se nécroser au bout de quelques semaines. Des observations réalisées à plus long terme ont montré qu'après six mois, une racine semble toujours vivante et qu'un bourgeon était apparu.

Pour les explants racinaires issus des différentes co-cultures (*A. rhizogenes* TR7 sauvage, *A. rhizogenes* TR7-*egfp*, *A. rhizogenes* TR7-*gus*), deux cas de figures ont été observés. Certaines racines ne poussaient pas, d'autre se développaient rapidement et formaient de très nombreuses ramifications (planche 38 f, g, h). Enfin, quelques racines se développaient de manière intermédiaire.

En plus de ces observations, nous avons pu identifier des racines ayant d'autres caractéristiques phénotypiques particulières :

- d'une part des racines épaisses, se développant rapidement en longueur et à géotropisme positif ;
- d'autre part, des racines secondaires plus fines, elles même très ramifiées, plagiotropiques et possédant de nombreux poils absorbants.

En terme d'interprétation, les racines ne pouvant pas se développer sont *a priori* des "racines témoins", non transformées et, ne possédant donc pas les oncogènes *rol* provenant d'*A. rhizogenes*. En effet, ceux-ci sont décrits comme permettant le maintien de la différenciation en racine et la croissance en absence d'auxine exogène. *A contrario*, les racines se développant très bien pourraient être transformées. Les racines présentant un comportement intermédiaire en culture *in vitro* seraient un cas à part. Elles pourraient correspondre à des explants initiaux prélevés à proximité de zones transformées ; elles seraient "chargées" en phytohormones qui leur permettraient de commencer à croître en boîte de Pétri.

Les racines présentant une croissance rapide ont été isolées et repiquées 7 fois sur boîte de Pétri avant d'être transférées en Erlenmeyer de 250mL pour culture en milieu liquide B5-30 sans céfotaxime.

III-7.4 Confirmation moléculaire de l'état transgénique des racines

Nous avons vu que les racines de plantes co-cultivées avec *A. rhizogenes* peuvent croître *in vitro* sans ajout d'hormones. Nous avons également observé la présence de fluorescence issue de la EGFP ainsi qu'une activité β -glucuronidase sur des racines issues de co-culture avec *ArTR7-egfp* et *ArTR7-gus*, respectivement. Pour montrer définitivement l'état transgénique de ces racines, nous avons recherché la présence des transgènes au sein de leur ADN. Cette caractérisation moléculaire a été réalisée par PCR en utilisant des amorces spécifiques de 3 gènes présents sur les 3 ADN-T utilisés dans nos expérimentations :

✚ Le gène *rol A* issu du plasmide pRi TR7 contenu dans *A. rhizogenes* TR7 sauvage (ce gène présent sur l'ADN-T et responsable du phénotype « hairy root » ; la présence de ce gène *rol* nous permet de valider l'aspect transgénique des racines dans le cas des co-cultures faites avec *ArTR7* sauvage).

✚ Le gène rapporteur *egfp* du plasmide pPE113 contenu dans l'ADN-T de *ArTR7-egfp*.

✚ Le gène rapporteur *gus* du plasmide pTDE4 contenu dans l'ADN-T de *ArTR7-gus*.

Afin de vérifier l'absence de contamination bactérienne dans nos cultures de racines (la céfotaxime n'étant qu'un bactériostatique et non un bactéricide), nous avons réalisé une PCR en utilisant des amorces spécifique du gène de virulence *vir A*. Ce gène, bien que présent sur le plasmide Ri est localisé en dehors du T-DNA et n'est donc pas transféré dans le génome de la plante. En effet, il est important d'être sûr que l'amplification des gènes issus de la transformation est bien le reflet de la présence des dits gènes dans le génome de la plante transformée et non due à une contamination des extraits d'ADN génomique par de l'ADN issu du plasmide de transformation (présence de bactéries résiduelles dans la culture des racines). Ces analyses ont été faites à partir de lignées racinaires isolées en boîtes de Pétri (7 subcultures) et cultivées en milieu liquide (Erlenmeyer de 250mL) en vue d'obtenir une biomasse suffisante pour permettre la réalisation de tous les pré-tests moléculaires qui se sont avérés nécessaires.

Choix des amorces

Le choix des amorces est une étape essentielle dans cette étape de caractérisation moléculaire. Si l'obtention des séquences nucléotidique des gènes codants pour EGFP et pour

GUS a été relativement aisée, il n'en est pas de même pour les séquences du plasmide Ri. En effet, la séquence du plasmide pRi TR7 sauvage n'est pas disponible dans les bases de données. Pour prouver qu'il y a eu insertion du gène bactérien dans les cellules des racines, nous avons donc recherché l'oncogène *rol A*, en nous appuyant sur la séquence décrite pour *A. rhizogenes* 1855 (Sevon *et al.* 1997).

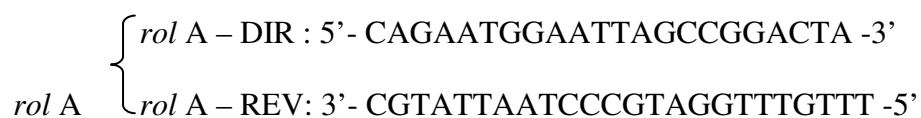
Par ailleurs, les amorces choisies pour l'amplification du gène *vir A* sont les suivantes :



Ces deux amorces permettant l'amplification d'une bande de 145pb.

III-7.4.1 Analyse des racines de type "ArTR7 sauvage"

Pour les racines de type *ArTR7* sauvage, nous avons cherché la présence du gène *rol A* au sein de leur ADN et l'absence du gène *virA*. Les séquences choisies sont celles décrites par Sevon *et al.* (1997) et le protocole pour les différentes étapes de PCR sont décrits ci-dessous :



Ces deux amorces permettant l'amplification d'une bande de 700pb.

	<i>rol A</i>	<i>vir A</i>
Dénaturation	94°C pendant 5 minutes	
30 cycles de :		
- Dénaturation	94°C pendant 30s	94°C pendant 30s
- Hybridation des amorces	50°C pendant 30s	62°C pendant 30s
- Elongation du brin complémentaire	72°C pendant 30s	72°C pendant 30s
- Elongation finale	72°C pendant 10 min.	72°C pendant 10 min.

Les résultats sont présentés dans la planche 39. Une recherche de la présence des transgènes a été réalisée sur 7 lignées racinaires correspondant à 7 plantes provenant de co-culture avec *A. rhizogenes* TR7 sauvage. La confirmation moléculaire est obtenue pour 5 échantillons sur 7 (71,4%). Des signaux d'amplification de taille correspondant au gène *rol A* sont observés dans les racines présentant le phénotype "hairy root". L'absence de contamination bactérienne a été vérifiée pour ces racines par la non amplification du gène bactérien *vir A* (planche 39). La différence d'intensité des amplifications de gène *rol* peut être expliquée par la nature chimérique des racines obtenues après infection.

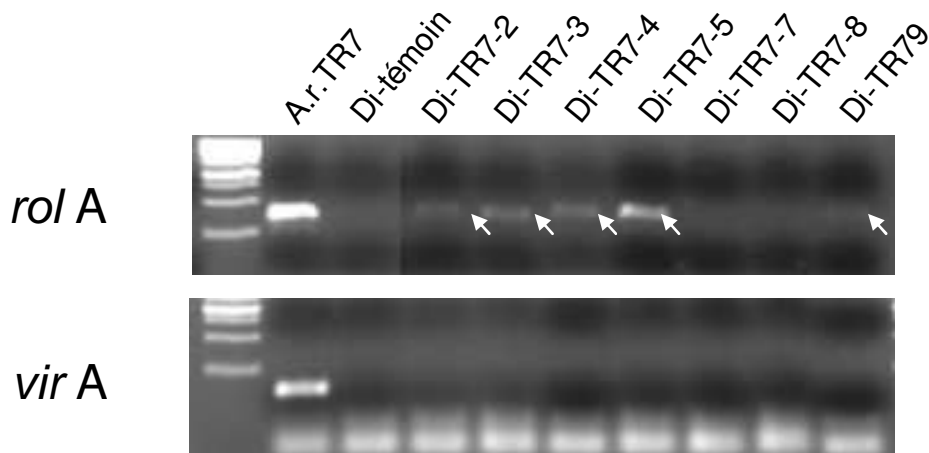
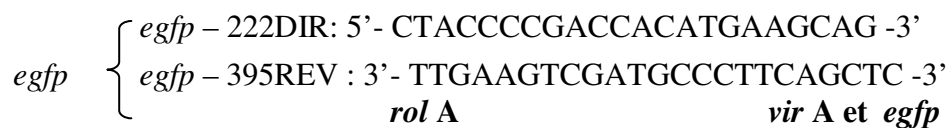


Planche 39: Gels d'électrophorèse des produits d'amplification PCR des gènes *rol A* (contenu dans le plasmide pRi TR7) et *vir A* (sur le plasmide Ri *A. rhizogenes* TR7 sauvage) dans des échantillons d'ADN de différentes lignées racinaires.

III-7.4.2 Analyse des racines de type "*ArTR7-egfp*"

Afin de mettre en évidence l'intégration du gène *egfp* dans le génome des racines issues de co-cultures de daturas avec *ArTR7-egfp*, des amorces spécifiques de *egfp* ont été synthétisées. L'utilisation de ces amorces dans les conditions décrites ci-dessous permet de réaliser l'amplification d'un fragment de ADN de 173 nucléotides.



Dénaturation	94°C pendant 5 minutes	
30 cycles de :		
- Dénaturation	94°C pendant 1min.	94°C pendant 1min.
- Hybridation des amorces	50°C pendant 1min.	62°C pendant 30s
- Elongation du brin complémentaire	72°C pendant 1min.	72°C pendant 1min.
- Elongation finale	72°C pendant 10 min.	72°C pendant 10 min.

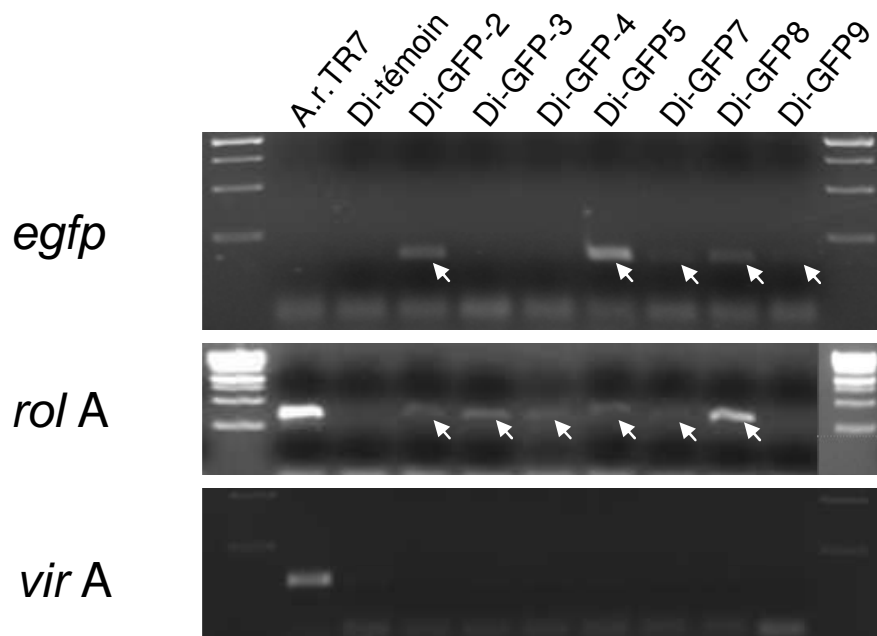


Planche 40 : Gels de migration des produits de PCR obtenus pour les gènes *rol A* (Plasmide pRi TR7), *egfp* (Plasmide pPE113) et *vir A* (Plasmide Ri d'*A. rhizogenes* TR7 sauvage) présents dans des échantillons d'ADN extraits de différentes cultures racinaires.

Nom de la lignée racinaire testée	Nombre de lignées montrant une fluorescence			Lignée considérée comme		
	très intense	intense	absente	exprimant la protéine EGFP	ayant intégré le gène <i>egfp</i>	ayant intégré le gène <i>rol A</i>
EGFP-2	4/4	0/4	0/4	+	+	+
EGFP-3	4/4	0/4	0/4	+	-	+
EGFP-4	2/4	2/4	0/4	+	-	+
EGFP-5	2/4	2/4	0/4	+	+	+
EGFP-7	2/4	2/4	0/4	+	+	+
EGFP-8	4/4	0/4	0/4	+	+	+
EGFP-9	4/4	0/4	0/4	+	+	-

Tableau 8: Récapitulatif des résultats obtenus par observation des lignées racinaires sous microscope à fluorescence et suite aux analyses moléculaires faites par PCR.

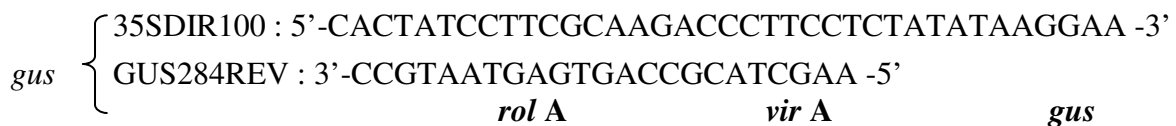
Sur les 7 échantillons analysés, 6 ont intégré le gène *rol A* (85,7%), et 5 possèdent assurément le gène *egfp*, (71,4%), dans leur génome (planche 40 et tableau 8). Aucun ne donne de bande correspondant au gène *vir A*, ce qui signifie que les PCR sont bien faites sur l'ADN des racines et qu'aucune contamination notable par des agrobactéries résiduelles ne vient biaiser notre analyse.

En conclusion, mis à part le cas de la lignée *egfp9* (tableau 8), toutes les lignées racinaires semblent bien être transformées avec les oncogènes. Ceci vient confirmer le fait que les lignées présentent le caractère phénotypique de racines transformées dont la

croissance est possible sans ajout de phytohormones. Pour les lignées testées, le gène *egfp* s'exprime systématiquement tout en n'étant pas mis en évidence par PCR (lignées *egfp3&4*, tableau 8). Il est probable que les racines de daturas soient chimériques et que le transgène soient présent en trop faible quantité dans les extraits de ADN génomiques. La présence de produits inhibant la réaction de PCR dans les extraits de DNA n'a pas permis de réaliser une amplification sur des quantités de matrice plus importantes. Néanmoins, la confirmation moléculaire devrait être poussée plus avant en réalisant, par exemple, une « nested PCR » sur les amplifications.

III-7.4.3 Analyse des racines de type "ArTR7-*gus*"

De la même façon, pour mettre en évidence l'insertion du gène *gus* dans le génome des racines issues de co-culture de plantes avec *ArTR7-gus*, des amorces ont été définies en se basant sur la séquence du gène *gus* (plasmide pTDE4). Les amorces décrites ci-dessous permettent l'amplification d'un fragment de ADN de 184 nucléotides.



Dénaturation	94°C pendant 5 minutes		
30 cycles de :			
- Dénaturation	94°C pdt 1min.	94°C pdt 1min.	94°C pdt. 1min.
- Hybridation des amorces	50°C pdt 1min.	62°C pdt 30s	55°C pdt. 30s.
- Elongation du brin complémentaire	72°C pdt 1min.	72°C pdt 1min.	72°C pdt. 1min.
- Elongation finale	72°C pdt 10 min.	72°C pdt 10 min.	72°C pdt. 10min.

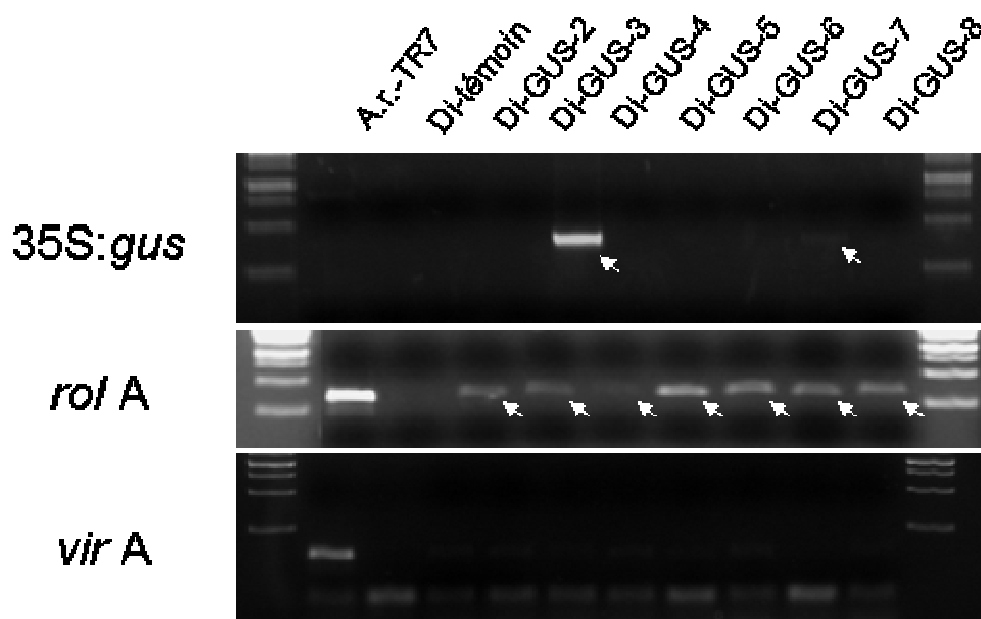


Planche 41 : Gels de migration des produits de PCR obtenus pour les gènes *rol A* (dans le plasmide pRi TR7), *gus* (dans le plasmide pTDE4) et *vir A* (plasmide Ri d'*A. rhizogenes* TR7 sauvage) présents dans des échantillons d'ADN extraits de différentes cultures racinaires.

Nom de la lignée racinaire testée	Nombre de lignées montrant une coloration bleue révélant l'activité GUS	Lignée considérée comme		
		exprimant l'enzyme GUS	ayant intégré le gène <i>gus</i>	ayant intégré le gène <i>rol A</i>
GUS-2	2/4	+	-	+
GUS-3	2/4	+	-	+
GUS-4	4/4	+	+	+
GUS-5	3/4	+	-	+
GUS-6	3/4	+	-	+
GUS-7	3/4	+	+	+
GUS-8	3/4	+	-	+

Tableau 9: Récapitulatif des résultats de tests histochimiques et d'analyse PCR obtenus sur les différentes lignées racinaires.

Sur les 7 échantillons de type "TR7-*gus*" testés, 7 (100%) possèdent la séquence *rol A* (planche 41), alors que seulement 2 (28,6%) se révèlent positifs en tests PCR réalisés sur le gène *gus*. Il s'agit probablement d'un problème lié à la PCR réalisé sur le gène *gus* et malgré tous nos efforts pour améliorer l'analyse, jusque là, nous n'avons pas pu obtenir de résultats plus précis. En d'autres termes, cette analyse PCR sous-évalue très fortement la proportion de lignées ayant intégré le gène *gus* car l'analyse histochimique qui ne fonctionne jamais sur les témoins, montre que toutes nos lignées expriment la présence de l'enzyme GUS.

Nous avons aussi constaté l'absence du gène bactérien *vir A* dans l'ADN végétal, ce qui prouve que nos racines ne sont pas contaminées par les agrobactéries.

La présence des gènes *rol A* est confirmée pour toutes les lignées racinaires *in vitro* obtenues à partir de plantes co-cultivées avec des agrobactéries en hydroponie. Ces racines sont donc bien le résultat de la transformation par *A. rhizogenes*, ce que confirme le fait qu'elles puissent pousser dans des milieux de culture sans ajout de phytohormones. L'obtention de produit de PCR dans tous les cas indique également que l'ADN que nous avons utilisé est propre pour l'amplification. Les résultats obtenus pour l'amplification des gènes codants pour la β -glucuronidase pourraient donc, encore une fois, être lié à un caractère chimérique des racines transformées.

En conclusion, les racines poussant en conditions *in vitro* sans hormones sont transformées. Elles expriment le plus souvent le gène rapporteur mais ceci n'est pas systématique, en particulier dans le cas des cultures *ArTR7-gus*.

III-7.5 Caractérisation de la croissance et du métabolisme des racines transformées

Les racines issues de cultures hydroponiques ont été repiquées 7 fois sur milieu solide avec ajout de céfotaxime (ce milieu est utilisé pour les trois types de racines). Ensuite, 8 bouts de racines d'une longueur de 1,5-2 cm ont été prélevés et mis en culture liquide sans céfotaxime (10mL de milieu B5-30). Après 6-7 jours, les racines sont coupées en trois et transférées dans un Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu B5-30. Elles se sont développées fortement en milieu liquide dépourvu de phytohormone et présentent toutes les caractéristiques des chevelus racinaires (planche 42).



Planche 42: Culture de racines en milieu liquide B5-30 (sans antibiotique et dépourvu de phytohormone) : observation faites après 16 jours de culture de 8 bouts de racines (1,5-2 cm). a: racines infectées TR7 sauvage, b) TR7-*egfp* et c) TR7-*gus*.

La croissance de trois sortes de racines (*ArTR7sauvage*, *ArTR7-egfp* et *ArTR7-gus*) a été évaluée après une période de culture de 16 jours. La biomasse de ces racines a été multipliée de 200 à 215 fois en moyenne. L'inoculum d'environ 0,02g a atteint 4-4,3 g de matière fraîche après 16 jours de culture (figure 92).

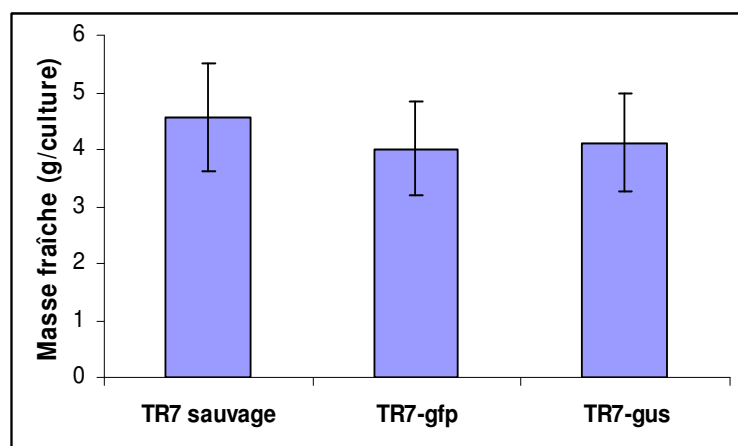


Figure 92 : Quantité de biomasse fraîche de racines de daturas produites à partir de 8 bouts de racines après 16 jours en culture liquide.

L'analyse du contenu en alcaloïdes a été réalisée sur les mêmes racines âgées de 16 jours dans le milieu B5-30. Ces résultats sont le reflet des 2 mois de repiquage des racines après récolte des plantes inoculées avec les agrobactéries. Ils sont comparés aux valeurs des racines témoins de *Datura innoxia* (figure 93).

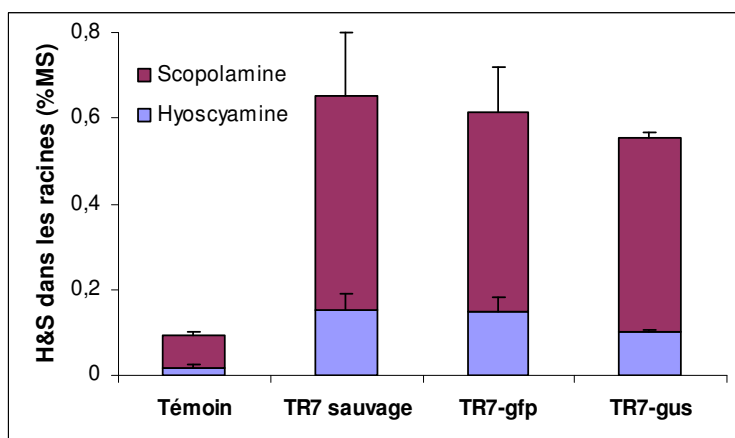


Figure 93: Contenu en H&S (hyoscyamine et scopolamine) de racines de daturas hydroponiques stériles (témoins) et de racines simplement (TR7sauvage) ou doublement transformées (TR7-*egfp* ou TR7-*gus*) obtenues à l'issue de la co-culture de plantes hydroponiques stériles avec les différentes souches d'*A. rhizogenes*.

Les résultats obtenus nous montrent une amélioration des capacités de production de H&S dans les racines transformées par rapport aux racines témoins. L'effet est significatif. Dans les racines "*Ar*TR7 sauvage", l'accumulation de H&S est 7,1 fois supérieure à celle mesurée chez les témoins. Elle est de 6,6 et 6,0 fois supérieure dans les racines "*Ar*TR7-*egfp*" et "*Ar*TR7-*gus*", respectivement (figure 93).

III-7.6 Discussion et conclusion partielle

Au cours de ce travail, nous avons utilisé la souche d'*A. rhizogenes* TR7 pour montrer que les effets observés suite à la co-culture datura-agrobactéries en hydroponie sont liés à l'occurrence d'évènements de transformation génétique. A partir de la souche *ArTR7* sauvage, deux souches modifiées hébergeant le gène rapporteur *egfp* ou *gus* ont été utilisées comme vecteurs de transformation génétique. La réalisation d'une co-culture plante-bactéries nous a permis de démontrer qu'il y avait bien occurrence d'évènements de transformation génétique.

Au niveau de la morphologie racinaire, nous avons également constaté que les racines chimériques ainsi obtenues après la co-culture avec *A. rhizogenes* sont plus ramifiées que le témoin; elles présentent une grande prolifération de racines latérales. Quelle que soit la souche microbienne utilisée (*ArTR7*, *ArTR7-egfp* ou *ArTR7-gus*), aucune différence ne peut être mise en évidence en terme de morphologie, de capacité de croissance de biomasse et de production d'alcaloïdes.

Ces racines surproduisent H&S par rapport au témoin, ce qui représente une amélioration très importante des potentialités de *Datura innoxia* (teneur d'environ 0,7%MS, soit 6-7 fois plus que le témoin).

Une analyse moléculaire a permis de démontrer la présence de gènes bactériens transférés de manière stable dans le génome des racines de datura. Ce travail a été effectué sur le gène *rol A*. Pour ces racines, une recherche de la présence des autres oncogènes *rol B*, *C* et *D* serait à proposer afin de déterminer exactement quels transgènes sont présents avant de passer à une étape d'étude de l'expression de ces gènes.

Nos travaux sont à mettre en lien avec de nombreux résultats décrits dans la littérature concernant l'usage d'*A. rhizogenes* en vue d'isoler et cultiver ensuite des racines transgéniques *in vitro* sous forme de chevelus (hairy roots). Les données les plus anciennes portaient sur l'usage de souches sauvages d'agrobactéries alors que, dans les plus récentes, des gènes d'intérêt ont parfois été transférés en plus des oncogènes.

Ainsi, Jouhikainen *et al.* (1999) rapportent une amélioration de plus de 100 fois de la teneur en scopolamine (par rapport au témoin) chez *Hyoscyamus muticus* transformée avec une construction intégrant un gène d'intérêt - introduit par le biais de l'ADN-T de pLAL21 - et codant la H6H. Chez *Duboisia*, Palazon *et al.* (2003), avec la même construction, ont obtenu des concentrations record de 2,5%MS de scopolamine dans leurs racines; soit une amélioration d'un facteur trois des capacités de production par rapport à leur lignée témoin.

Par ailleurs, les travaux de Déchaux-Duval (2005) ont montré qu'il existe un lien entre la production des alcaloïdes et l'insertion d'un gène H6H exogène (hétérologue) dans la cellule de *Datura innoxia*. Pour l'hyoscyamine, la concentration des lignées productrices est deux fois supérieure à celle de la lignée témoin. Aussi, elle est cinq fois supérieure pour la scopolamine.

Pour ce qui concerne notre travail, l'insertion du gène *rol A* issu du plasmide pRi TR7 a mené à une amélioration des capacités de production alcaloïdique des racines de *Datura innoxia*. Ces observations, sont à mettre en lien avec les résultats de transformation obtenus par Bonhomme (2000) en utilisant d'une souche d'*A. rhizogenes* sauvage (15834) et d'*A. tumefaciens* modifiée (*rol ABC*). Ces travaux montraient en effet que le transfert de gènes *rol* d'*A. rhizogenes* conduisait à une modulation du métabolisme des phytohormones et induisait une différenciation cellulaire chez *Atropa belladonna*. Bonhomme (2000a) rapporte ainsi que:

- ✓ le gène *rol A* influence la différenciation cellulaire,
- ✓ le gène *rol C* seul est suffisant pour stimuler le métabolisme alcaloïdique, et que
- ✓ les gènes *rol ABC* ont une action synergique.

De même, Déchaux-Duval (2005) a montré qu'une transformation de *Datura innoxia* par le plasmide pRi 1855 seul permettait l'induction du métabolisme secondaire, augmentait les capacités de production des racines par le seul biais de ces gènes *rol*; comme cela a été montré par différentes équipes avec d'autres souches bactériennes (Pinol *et al.*, 1996 ; Palazon *et al.*, 1998 ; Bulgakov *et al.*, 1998 ; Bonhomme *et al.*, 2002, 2000b). Par contre, pour Diop *et al.* (2007), la présence des gènes *rol ABC* d'*A. rhizogenes* n'induirait pas une amélioration d'alcaloïde recherchée dans les racines transgéniques de *Leucosium aestivum*.

De manière plus globale, les résultats décrits dans la littérature et comparant des cultures *in vitro* de racines normales ou de hairy roots sont à replacer par rapport à nos propres éléments fournis par des expérimentations sur plantes entières. Il est possible d'obtenir des plantes aux racines chimérique et, à notre connaissance, peu des résultats ont été décrits à ce niveau jusque là. Un article majeur vient cependant d'être publié (Veena et Taylor, 2007) et il antécipise en partie notre travail. Ces auteurs parlent de "*ex vitro* composite plants" qu'ils comparent à des racines transformées classiques (hairy roots).

En conclusion, c'est tout un champ d'exploration qui peut s'offrir à nous en terme d'étude de modification du métabolisme suite à l'interaction plante-agrobactérie. Il existe aussi

là un fort potentiel pour découvrir de nouveaux matériels biologiques pour la production de métabolites secondaires d'intérêt en réalisant un criblage sur des couples plantes-souches d'*Ar* en conditions hydroponiques.

Il n'est bien évidemment pas question d'utiliser des souches microbiennes modifiées dans un espace hors *in vitro*. Cependant, le recours large à l'inoculation des solutions nutritives par des souches sauvages est certainement l'une des voies majeures d'amélioration du potentiel des cultures hors sol pour la production de métabolites secondaires végétaux selon la technologie "Plantes à Traire".

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de ma Thèse a été de déterminer l'effet de facteurs de l'environnement sur *Datura innoxia* Mill. Il s'agissait de hiérarchiser leurs effets potentiels pour moduler les pratiques culturales en vue d'améliorer le rendement en métabolites secondaires dans le procédé hors sol baptisé "plantes à traire". Nous avons orienté nos travaux selon des critères techniques (faisabilité dans le temps) et des critères pratiques (transposabilité potentielle à l'échelle industrielle).

Par les travaux précédents de Tran (2005), nous savions que la biomasse produite par le *Datura innoxia* cultivé en hydroponie pouvait être 2 à 3 fois plus importante que celle obtenue en terre. De ce point de vue, il y avait donc un avantage à travailler en culture hors sol. Nous avons donc cherché à améliorer les conditions de culture en jouant sur l'environnement physique et chimique dans le but de favoriser la croissance de la plante et la production de métabolites secondaires.

Nos premières expérimentations en serre ont permis de montrer que **l'aération de la solution nutritive joue un grand rôle dans la croissance et l'accumulation des alcaloïdes** chez *Datura innoxia* Mill.. L'expérimentation a permis de démontrer l'intérêt d'un **régime d'immersion temporaire** utilisé pour améliorer la disponibilité en oxygène pour les racines. La croissance des plantes et l'accumulation d'hyoscyamine et de scopolamine (H&S) sont améliorées: au bout de 7 semaines, **la teneur en H&S est** plus que **doublée** (X 2,4) comparativement au témoin de référence en immersion permanente avec bullage d'air à 0,1vvm. En tenant compte de l'amélioration de la production de biomasse, **la production nette de H&S est triplée** (X 3,2).

La nécessité d'une bonne aération pour une alimentation normale des plantes est connue depuis longtemps. Un manque d'oxygène conduit à l'hypoxie, à l'anoxie puis à l'asphyxie racinaire avec une mort de la plante. Les besoins en oxygène des racines vont dépendre de l'activité métabolique elle-même liée à la température et aux produits de la photosynthèse. Les besoins en oxygène sont aussi fonction de la quantité de biomasse.

En effet, la consommation d'oxygène par les racines augmente avec l'éclairement des feuilles qui agit sur le processus photosynthétique (Huck *et al.*, 1962). Elle dépend également de la pression partielle de ce gaz (Gislerod et Adams, 1983), et pour certaines plantes, du volume racinaire. Les travaux de Schapira *et al.* (1990) sur la culture de tomate et de concombre montrent que pour un volume racinaire de 3,14g/L de solution nutritive chez la tomate et 20% d'oxygène au départ, l'épuisement est linéaire et régulier jusqu'à une pression partielle de 4 à 7% où la diminution devient de plus en plus lente. La capacité limite d'utilisation de l'oxygène dissous se situerait au voisinage d'une pression partielle de 1% pour les racines de tomate et de concombre. La disparition quasi-totale de l'oxygène dissous s'effectue entre une heure et deux heures trente après le début de l'expérimentation.

Dans le cas de datura, nous montrons que l'amélioration de la disponibilité de l'oxygène est favorable à la croissance et à l'accumulation de métabolites d'intérêt. Une analyse plus approfondie pourrait être faite en utilisant des **systèmes de mesure et de contrôle de l'oxygène dissout**. Ceci pourrait permettre de **déterminer précisément les besoins du système racinaire en fonction de la croissance de la plante et en lien avec les facteurs de l'environnement** que sont la lumière et la température. Dans un second temps, les paramètres ainsi quantifiés devraient être redéterminés au niveau des **peuplements**. Ainsi, on pourrait imaginer de piloter au plus juste l'apport d'oxygène en fonction des besoins réels.

En attendant de disposer de telles données, il convient de chercher à permettre une oxygénation maximale de la solution nutritive. Cet objectif peut être atteint en immersion temporaire mais des essais conduits sur des pilotes de 16m² se sont avérés peu concluants. En effet, s'il est possible et facile de travailler en immersion temporaire à moyenne échelle, dès que la taille de système augmente, des limitations en terme de débits pour le transfert de l'eau commencent à apparaître.

Il est alors possible d'envisager de **buller de l'oxygène** à la place de l'air. Néanmoins cette solution peut avoir un coût non négligeable. Le recours à la **culture en aéroponie** peut être une excellente alternative. Dans ce cas, il conviendra de sécuriser le système en évitant toute panne d'arrosage et en veillant à ne pas laisser la température atteindre des valeurs hautes au niveau des racines de plantes. A moindre frais, la réalisation d'une **culture en eau profonde** peut être une solution acceptable. Dans ce cas, l'augmentation du volume d'eau permet la mise en place de systèmes de bullage plus puissants (bullage de gaz ou injection d'air par effet venturi). Cette option peut présenter d'autres avantages que nous évoquerons ensuite.

Nous avons analysé l'influence de la température sur la croissance des plantes et l'accumulation d'hyoscyamine et de scopolamines (H&S). Ce travail nous a permis de montrer que, partant d'un stade 5 feuilles, il fallait compter 410 degrés jours en base 10,9°C pour atteindre le stade émergence du premier bouton floral. Le réchauffement de la solution nutritive dans le cas de cultures réalisées dans une serre peu chauffée permet d'atteindre le même stade phénologique plus tôt avec seulement 336 degrés jours (température de l'air). A notre connaissance, c'est la première fois que de tels paramètres sont décrits. A savoir que:

- ✚ **datura a besoin de 410°C jours pour passer du stade 5 feuilles au stade émission du premier bouton floral** en hydroponie ;
- ✚ la croissance chez datura se fait au delà d'une **base de température de 10,9°C jours** (base 10,9) ;
- ✚ le réchauffement de la solution nutritive de deux degrés a un effet sur la température de base apparente (10,9°C) qui se retrouve diminuée de 2°C (8,9°C).

Dans le cas de cultures réalisées dans des serres peu chauffées, il convient donc préférentiellement d'orienter la dépense d'énergie pour réchauffer la solution nutritive plutôt que l'ensemble de la serre.

En terme de perspectives, une analyse précise des effets de la température, couplée à l'impact de l'oxygénation de la solution nutritive et en lien avec la durée du jour et l'intensité de la lumière serait un projet pertinent à développer. Les retombées en terme d'application pourraient être immédiates mais, par contre, l'intérêt et surtout la valorisation académique seraient probablement minimes.

Les effets de la lumière ont été abordés au cours de ce travail de Thèse. Des jours longs et une lumière naturelle favorisent la croissance. En période de jours courts, une complémentation de la lumière par un éclairage artificiel peut être favorable à la croissance des plantes. **Des lampes à vapeur de sodium sont plus efficaces que des lampes à vapeur de mercure.** En terme de teneur alcaloïdique dans la biomasse, le meilleur résultat a été obtenu en jours courts, dans une serre relativement sombre, avec des nuits fraîches et un complément de lumière dispensé par des lampes à vapeur de sodium. Ainsi, 40 mg de H&S ont été accumulés dans les plantes, soit une productivité de **4g de H&S/m² en 8 semaines.**

Là encore, pour compléter nos travaux, on peut imaginer de tester spécifiquement l'effet de la lumière en jouant sur le spectre, la durée d'éclairement et l'intensité de la lumière. En

effet, Afreen *et al* (2005) ont montré que chez *Glycyrrhiza uralensis*, la qualité spectrale de la lumière et les UV-B peuvent avoir un effet significatif sur la croissance et le métabolisme secondaire. Cependant, l'extrapolation au niveau de grandes cultures en serres ne semble pas évidente à mettre en oeuvre.

Pour déterminer dans quelle mesure les plantes pouvaient voir leur croissance et métabolisme modulés par la composition de la solution nutritive, nous avons réalisé une recherche sur la fertilisation azotée. Une limitation de la croissance a été induite par une faible disponibilité en nitrate dans la solution nutritive. Les plantes les plus faiblement alimentées ont eu une croissance limitée comme il est classiquement démontré en cas de carence en azote dans le milieu. Nous avons étudié la relation entre la teneur en azote et en carbone accumulés et la teneur en alcaloïdes dans la plante, en vue de déterminer la dose optimale pour la production. Le plus fort rendement en matière sèche et la plus haute quantité de métabolites secondaires ont été obtenus avec 15mM de NO_3^- dans la solution nutritive. Cette valeur semble correspondre à la valeur seuil permettant la satisfaction des besoins de la plante en azote. Les traitements à faibles disponibilités azotées ($\leq 0,3$ mM) ont permis d'obtenir des teneurs en alcaloïdes plus fortes que ceux à fortes disponibilités (≥ 3 mM). Dans ces cas, comme la croissance est plus faible, la quantité de H&S produite reste basse.

A contrario, une concentration élevée en nitrate (39,4mM) engendre une moindre croissance des plantes et une teneur en H&S faible. Un bon compromis semble correspondre à un apport d'azote à 39,4mM en une seule fois sans réajustement. Autrement dit, l'utilisation d'une solution nutritive de Murashige et Skoog apportée uniquement en début de culture et sans réajustement ultérieur semble donner de bons résultats. D'après nos expériences, on peut même supposer que **l'optimum se situerait autour d'une** valeur moitié moindre (**solution MS/2**), ce qui permettrait de démarrer une croissance forte puis, suite à l'épuisement de l'azote, de favoriser dans un second temps, l'accumulation de H&S dans les tissus végétaux. Cette hypothèse serait à tester à l'avenir. La comparaison de dilutions de la solution de MS (1/16; 1/8; 1/4; 1/2; 1; 2) serait effectivement possible et pourrait très probablement apporter une réponse directe quant à l'optimum de fertilisation azotée en conditions de production (apport unique, utilisation d'une solution unique).

Pour compléter nos investigations, nous avons choisi de tester l'effet du pH de la solution nutritive. Des travaux non présentés ici ont montré qu'un pH initial éloigné de la référence de 5,8 (pH de la solution MS) est assez rapidement rééquilibré au cours de la culture et aucune différence ne subsiste ensuite entre les modalités. Lorsque le pH est maintenu au

cours de la culture, seule la valeur la plus faible (pH 3) a eu un effet très significatif avec une réduction de la croissance. En conséquence, bien que les teneurs en H&S aient été augmentées de 50%, nous avons observé une diminution de la production totale d'alcaloïdes.

Nos travaux ont donc montré que *datura* est capable de s'adapter à une relativement large gamme de valeurs de pH de la solution nutritive. Ce résultat est rassurant car la culture des plantes pourra résister à une dérive du pH en cas d'incident. Le fait que le pH acide (pH 3) induise une augmentation de la teneur en H&S dans la plante nous amène à nous demander si il ne serait pas intéressant d'imaginer un système de culture en deux temps :

- 🚧 une phase de production de biomasse sur une solution MS/2 à pH5-6.
- 🚧 une phase d'accumulation d'alcaloïdes en solution « pauvre » en azote et à pH entre 3 et 4.

Un tel découplage entre production de biomasse et synthèse d'alcaloïdes constitue une perspective importante pour l'avenir en vue d'augmenter les rendements en molécules d'intérêt dans les cultures hydroponiques.

Après avoir démontré que certains facteurs environnementaux (oxygène, température, lumière, pH et nutrition azotée) avaient des effets positifs sur la croissance ainsi que sur la synthèse de métabolites secondaires, nous avons cherché à déterminer l'influence des facteurs biotiques.

Nous avons prouvé que dans les solutions non stériles en serre, des populations microbiennes pouvaient s'installer. Par la forme et la couleur des colonies obtenues sur boîtes de Pétri, nous avons généralement pu distinguer de vingt à vingt-cinq types de microorganismes se développant naturellement. **Cette microflore provoque une dégradation des molécules d'intérêt** libérées par les racines. **Elle induit aussi une moindre accumulation de H&S dans la plante.**

En résumé, on peut dire que la microflore qui se met en place dans les cultures provient de contaminations issues de germes présents dans l'eau, sur les matériaux utilisés, dans la serre, ou bien apportés par les semis ou les expérimentateurs. La diversité microbienne doit donc être moindre que celle susceptible d'être rencontrée dans un sol en plein champ. De plus, d'une culture à l'autre, les populations peuvent vraisemblablement être très différentes car **le système hydroponique présente une "faible inertie" sur le plan microbiologique (contrairement à un sol).**

Nous savons aussi que l'élimination des bactéries serait une erreur en système hors sol. En effet, notre expérience a montré que l'usage temporaire de chlore actif pour éradiquer les bactéries conduit ensuite à une explosion de la microflore; microflore fongique tout particulièrement.

La situation est donc la suivante :

- la microflore s'installant naturellement a des effets négatifs sur le procédé hors-sol.
- la microflore est constituée d'un nombre limité de populations microbiennes
- il n'est pas question de réaliser des cultures stériles
- il est difficile de contrôler les effets indésirables de la microflore en appliquant des traitements biocides.

Si la microflore a globalement un effet négatif sur le procédé, nous ne savons pas si chaque microorganisme a un effet négatif en soit. Autrement dit, il existe probablement un équilibre entre microorganismes à effet négatif et microorganismes à effet positif. Partant de ces éléments, une perspective majeure serait de réaliser des cultures axéniques et de tester, un à un, les effets de chacun des microorganismes isolés afin de déterminer lesquels ont un effet réellement négatif. Il conviendrait d'élargir l'étude à d'autres espèces issues de différentes rhizosphères et décrites comme ayant un effet stimulateur des cultures (PGPR: plant growth promoting rhizobacterias). On conçoit bien qu'un tel travail serait conséquent et qu'il devrait faire l'objet d'au moins une Thèse avant d'espérer pouvoir disposer de résultats applicables au niveau industriel.

Il est à noter que **les cultures stériles** mises en oeuvre au cours de cette Thèse **ont conduit à l'obtention de plantes présentant de hautes teneurs relatives en alcaloïdes**. Nous avons émis l'**hypothèse d'un cycle d'excrétion-réabsorption des alcaloïdes** dans la solution nutritive et la présence de microorganismes susceptibles de dégrader les molécules serait alors directement responsable d'une moindre accumulation de ces composés d'intérêt dans les tissus végétaux.

Dans l'idée que certains microorganismes pourraient avoir un effet positif sur les cultures nous avons choisi d'étudier *Agrobacterium rhizogenes*. C'est une bactérie du sol capable de réaliser un transfert d'information génétique dans des cellules végétales et de les faire se différencier en racines autonomes. Nous avons démontré que *A. rhizogenes* avait un

effet favorable sur la croissance et la production de métabolites secondaires. L'inoculation de ces agrobactéries dans la solution nutritive a pu donner lieu à des transferts naturels de gènes induisant ainsi l'obtention de systèmes racinaires chimériques regroupant des racines normales et des racines modifiées. L'utilisation des gènes rapporteurs a permis de démontrer ce phénomène et, mis à part le tout dernier article de Veena et Taylor (In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant, 2007, 43 : 383-403), c'est, à notre connaissance, la première fois qu'un tel phénomène est décrit et illustré. **L'état transgénique d'une partie des racines a** par ailleurs **été prouvé** sur le plan moléculaire.

La conséquence de cet état chimérique se traduit par une surproduction et suraccumulation d'alcaloïdes dans les tissus de datura. Les résultats obtenus ici sont parmi les meilleurs que nous ayons pu relever au cours de la Thèse.

En perspective générale, les voies d'amélioration de la culture de *Datura innoxia* en hydroponie pour la production d'alcaloïdes tropanique par la technologie "plantes à traire" passent probablement par :

- ✚ une utilisation systématique d'agrobactéries sauvages ;
- ✚ une pratique d'apport d'azote limité, voire en deux temps, pour réaliser une phase de croissance puis une phase de bioproduction de H&S ;
- ✚ la réalisation d'un effort concernant l'oxygénation des solutions nutritives (eau profonde ou aéroponie) ;
- ✚ la réalisation d'un effort en vue de piloter les paramètres climatiques de la serre :
 - limiter les pics de température,
 - limiter les basses températures,
 - favoriser des nuits fraîches 15°C,
 - limiter l'échauffement de la solution nutritive pour favoriser apport d'oxygène et respiration non limitée.

En termes plus académiques, un travail approfondi sur la microflore et la sélection d'espèces ou de populations microbiennes à effet favorable (PGPR) semblerait pertinente et constituerait un atout en vue d'améliorer encore le système "plantes à traire".

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Abdelhafeez A. T., Harssema H., Veri G. and Vekerker K (1971).** Effects of soil and air temperature on growth, development and water use of tomatoes. *Neth. J. Agric. Sci.*, 19 (6): 67-75.
2. **Afreen F., Zobayed S. M. A. and Kozai T. (2005).** Spectral quality and UV-B stress stimulate glycyrrhizin concentration og *Glycyrrhiza uralensis* in hydroponic and pot system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 1074-1081.
3. **Agrawal G. K., Jwa N. S., Iwahashi H., Rakwal R. (2003).** Importance of ascorbate peroxidases OsAPX1 and OsAPX2in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcription profiling. *Gene*, 322: 93-103.
4. **Al Balkhi M. H. (2004).** Etude du métabolisme des alcaloïdes tropaniques dans les racines trangéniques de *Datura innoxia*: Identification par LC-MS et isolement par HPLC prépaative de composés intermédiaires et dérivés. *Rapport de diplôme d'étude approfondies de l'Université de Picardie Jules Verne*, 24p.
5. **Angersbach A., Heinz V. et Knorr D. (2000).** Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.* 1: 135-149.
6. **Aoki T., Matsumoto H., Asako Y., Matsumaga Y., Shimomura K. (1997).** Variation of alkaloid productivity among several clones of hairy root and regenerated plants of *Atropa belladonna* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* 15834. *Plant Cell Rep.*, 16: 282-286.

B

7. **Bais H. P., Park S. W., Weir T. L, Callaway R. M., Vivanco J. M. (2004).** How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in plant Science*, 9, 1: 26-32.
8. **Bais H. P., Loyola-Vargas V. M., Flores H. E., Vivanco J. M. (2001).** Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cell. Dev.-Plant*, 37: 730-741.
9. **Bajaj Y. P. S. (1999).** Biotechnology in agriculture and forestry 45, transgenic medicinal plants. *Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 372p.
10. **Baranski R., Klocke E. and Schumann G. (2006).** Green fluorescent protein as an efficient selection marker for *Agrobacterium rhizogenes* mediated carrot transformation. *Plant Cell Rep.*, 25: 190–197.
11. **Baskin J. M., Ludlow C. J., Harris T. M. and Wolf F. T. (1967).** Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subacaulis* (Leguminosae). *Phytochemistry*, 6: 1209-1213.
12. **Birch R. G. (1997).** Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 297-326.

13. **Boitel-Conti M., Laberche J.C., Lanoue A., Durocq., Sangwan-Norred 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.
14. **Boitel-Conti M., Laberche J.C., Gontier E., Sangwan-Norrel B. S. (1996).** Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill. Hairy root culture. *Plant Cell Reports*, 16: 241-244.
15. **Boitel-Conti M., Gontier E., Laberche J.C., Ducrocq C., Sangwan-Norrel B.S. (1995a).** Permeabilization of *Datura innoxia* hairy root for release of stored tropane alkaloids. *Planta Medica*, 61: 287-290.
16. **Boitel-Conti M., Gontier E., Laberche J. C., Ducrocq C., Sangwan-Norrel B.S. (1995b).** Culture de racines transformées de *Datura innoxia* Mill. en bioréacteur : comparaison de 3 types de procédés. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences*, 318: 593-598.
17. **Boitel M., Gontier E., Assaf C., Laberche J. C. et Sangwan B. S. (1997).** Procédé de production de métabolites primaires et secondaires à partir d'organes végétaux cultivés *in vitro*. *France n°FR 97 00641*, 22 janvier 1997.
18. **Bonhomme V. L. F. (2002).** Transformation génétique de plantes médicinales : *Atropa belladonna* et *Papaver somniferum* Var. Album par les gènes *rol* impact sur le métabolisme alcaloïdique. *Thèse de doctorat, Université de Picardie Jules Verne en Biotechnologies*. France, 159 p.
19. **Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Fliniaux M.A., (2000b).** Effects of the *rol C* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *J. Nat. Prod.*, 63: 1249-1252.
20. **Bonhomme V., Laurain-Mattar D., Lacoux J., Fliniaux M.A., Jacquin-Dubreuil A. (2000a).** Tropane alkaloid production by hairy root of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing *rol A, B, C* genes only. *J. Biotechnology*, 81: 151-158.
21. **Bouami-Guennouni-Assimi R. Cosson L. et Jacquin-Dubreuil A. (1990).** Selection and improvement of *Datura innoxia* Mill. ; Morphological variability *in vitro* propagated plants. *Bull. Sco. Bot. Fr, 137, Let. Bot.*, 4/5: 261-269.
22. **Bouma T. J., Nielsen K. L. and Koutstaal B. (2000).** Sample preparation and scanning protocol for computerised analysis of root length and diameter. *Plant and soil*, 218: 185-196.
23. **Bourgaud F., Gravot A., Gontier E. (2001).** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.
24. **Bourgaud F. (1990).** Etude de la biologie de plantes du genre *Psoralea* (Légumineuses), production de furocoumarines à intérêt pharmaceutique. Essais de culture *in-vitro*. *Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques*, France, 135 p.
25. **Brown S. A. and Tabot C. (2003).** Green Fluorescent Protein (GFP). Seeking to be precise. LA biologie végétale face aux enjeux de la génomique fonctionnelle. Paris-Orsay.
26. **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie – Plantes médicinales. *Lavoisier Eds, Paris*. 3^{ème} édition 1120 pages.
27. **Bruneton J. (1996).** Plantes toxiques, Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, *Tec&Doc, ed. Paris*.
28. **Bryant J. P., Reichardt P. B., Clausem T. P. and Werner R. A. (1993).** Effects of mineral nutrition on delayed inducible resistance in Alaska parper birch. *Ecology*, 74: 2072-2084.
29. **Buchon L. (1996).** Etude de l'influence des phytohormones sur la différenciation cellulaire en relation avec la production d'alcaloïdes morphiniques par des cellules de Pavot (*Papaver*

somniferum album). Effet des apports exogène en phytohormone ainsi que la transformation génétique par diverses souches d'*Agrobacterium*. DEA Génie Enzymatique, Biconservation et Microbiologie, Université de Picardie Jules Verne.

30. **Bulgakov V. P., Khodakovskaya M. V., Labetskaya N. V., Chernoded G. K. and Zhuravlev Y. N. (1998).** The impact of plant *rol C* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures. Phytochemistry, 49 (7): 1929-1934.

C

31. **Cardarelli M., Spano L., Mariotti D., Mauro M. L., Van Sluys M. A. and Costantino P. (1987b).** *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. Mol. Gen. Genet. 209: 457-480.
32. **Cardarelli M., Spano L., Mariotti D., Mauro M. L., Van Sluys M. A. and Costantino P. (1987a).** The role of auxin in hairy root induction. Mol. Gen. Genet. 208: 457-463.
33. **Carolin M and Yu O. (1994).** Analysis of the time course of change in nitrogen content in *Dactylis glomerata* L. using a model of plant growth. Ann Bot. 54: 69-76.
34. **Chadhary S.K., Ceska O., Warrington P.J. et Ashwood-Smith M. J. (1985).** Increased furocoumarin content of celery during storage. J. Agr. Food. Chem., 33 (6):1153-1157.
35. **Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W. and Prasher D. C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 263: 802-805.
36. **Chilton M. D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaki D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W. (1977).** Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell 11: 236-271.
37. **Chilton M. D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempé J. (1982).** *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. Plan Cell Rep., 7: 111-114.
38. **Chory J., Nagpal P. and Peto C. A. (1991).** Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affect light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. Plant Cell, 3: 445-459.
39. **Christen P., Roberts M. F., Phillipson J. D., Evans W. C. (1990).** Alkaloids of hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. Plant Cell Rep., 9: 101-104.
40. **Chun C. and Kozai T. (2002).** Artificial lighting for producing quality transplants in closed systems. ISHS Acta Horticulturae 580: IV, Proc. 4th IS on Artif. Light: 43-47.
41. **Cipollini M. L., Paulk E. and Cipollini D. F. (2002).** Effect of nitrogen and water treatment on leaf chemistry in horsenettle (*Solanum carolinense*), and relationship to herbivory by flea beetles (*Epitrix spp.*) and tobacco hornworm (i). J. Chem. Ecol., 28 : 2377-2398.
42. **Cooper A. (1979).** The ABC of NFT. Grower Books, London, 181p.
43. **Cormack B. P., Valdivia R. and Falkow S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene, 173:33-38.
44. **Cornillon P. (1985).** Influence de la température des racines sur la croissance et la nutrition des plantes. Les a.t.p. de l'INRA d'Avignon : les cultures hors sol, 221-234.
45. **Cosson L., Escudero Morales A. et Cougoul N. (1978).** La régulation écophysiologicals du métabolisme des alcaloïdes tropaniques (hyoscyamine et scopolamine). Ph. Méd. Et Phyt., XII, 4 : 219-326.
46. **Cosson L. (1976).** Importance des facteurs climatiques et des étapes du développement dans la productivité des alcaloïdes tropaniques. Etudes de Biologie Végéale, R. Jaques Edit. Paris, 483-494.

47. **Cosson L. (1972).** Influence de l'éclairement sur la teneur en alcaloïdes tropaniques des *Datura* : analyse des processus pouvant en expliquer les effets. Thèse de doctorat d'Etat, Université de Paris VI.
48. **Cougoul N., Miginiac E. et Cosson L. (1979).** Un gradient métabolique: rapport scopolamine/hyoscyamine dans les feuilles de *Duboisia myoporoides* en fonction de leur niveau d'insertion et du stade de croissance. Phytochem., 18 :949-951.
49. **Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M. (1997).** Natural products in drug discovery and development. J. Nat. Prod., 60: 52-60.
50. **Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000).** Natural Products (Secondary metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Buchanan B., Grissem W, Jones R. (eds). Americ. Soc. of Plant Physiologists. 1250-1318.
51. **Cusido R.M., Palazón J., Piñol M.T., Bonfill M. et Morales C. (1998).** *Datura metel* : *in vitro* production of tropane alkaloids. Planta Med., 65: 144-148.

D

52. **Daniel H., Streatfield S. J. and Wycoff (2001).** Medicinal molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccine in plants. Trends Plant Sci, 6: 219-226.
53. **Dechaux-Duval C. (2005).** Modulation de la voie de biosynthèse de la scopolamine chez *Datura innoxia* Mil. : Expression du gène *h6h* d'*Hyoscyamus niger* dans des racines transgénique obtenues par transformation via *Agrobacterium rhizogenes*. Thèse de doctorat, Université de Picardie Jules Verne, France, 142p.
54. **Demeyer K. et Dejaegere R. (1997).** The influence of the Ca²⁺/K⁺ balance and light energy on alkaloid content and partitioning in *Datura stramonium*. Aust. J. Bot., 1997, 45: 81-101.
55. **Demol J, Baudoin J. P., Louant B. P., Maréchal R., Mergeai G. et Otoul E. (2002).** Amélioration des plantes : Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Les presses agronomiques de Gembloux, 526p.
56. **Dermeyer K. et Dejaegere R. (1989b).** Influence of ion-balance in the growth medium on the yield and alkaloid content of *Datura stramonium* L. Plant Soil, 114: 289-294.
57. **Dermeyer K., Van De Velde H. et Dejaegere R. (1989a).** Influence of IAA and DMAA on hyoscyamine and scopolamine production in *Datura stramonium* L. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 54, 4a: 1313-1318.
58. **Desailly I., Fliniaux M. A. et Jacquin-Dubreuil A. (1988).** Etude de la distribution des alcaloïdes dérivés de l'acide tropanique chez *Datura stramonium* L. par dosage immunoenzymatique : localisation tissulaire et subcellulaire. C.R. Acad. Sci. Paris Série III, 306 : 591-596.
59. **Dessaux Y., Petit A., Tempé J. (1993).** Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. Phytochemistry, 34: 31-38.
60. **Diop M. F. (2007).** Etude de l'impact de la différenciation cellulaire sur la biosynthèse et l'accumulation de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae). Thèse de doctorat, Nancy Université Henri Poincaré en Biologie Cellulaire, France, 130p.
61. **Diop M. F., Hehn A., Ptak A., Chrétien F., Doerper S., Gontier E., Bourgaud F., Henry M., Chapleur Y. and Laurain-Mattar D. (2007).** Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L. – relationships to galanthamine content. Phytochem. Rev., 6: 137-141.
62. **Doares S. H., Syrovets T., Weiller E. W. and Ryan C. A. (1995).** Oligalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 4095-4098.

63. **Dorais M. and Gosselin A. (2002).** Physiological response of greenhouse vegetable crops to supplemental lighting. *ISHS Acta Horticulturae 580: IV, Proc. 4th IS on Artif. Light*: 59-67.
64. **Duez P., Chamart S., Hanocq M., Molle L., Vanhaelen M. et Vanhaelen-Fastre R. (1985).** Comparison between thin layer chromatography-densitometry and high performance liquid chromatography for the determination of hyoscyamine and hyoscyne in leaves fruits and seeds of *Datura (Datura ssp.)*. *J. Chrom.*, 529: 415-421.

F

65. **Fajer E. D., Bower M. D. and Bazzaz F. A.(1992).** The effect of nutrients and enriched carbon dioxide environment on production of carbon-based allelochemicals in *Plantago*: a test of the carbon nutrient balance hypothesis. *Am. Nat.* 140: 707-723.
66. **Farnsworth N. R. et Soejarto D. D. (1991).** Conservation of medicinal plants. Akerel O, Heywood V, Synge H, (Eds) *Cambridge University Press*, p: 25-52.
67. **Faye L., Landry N., Lerouge P., Gomord V. and Vézina L. P. (2001).** La production de protéines à usage biopharmaceutique dans les plantes. *Médecine/Science*, 17 : 867-877.
68. **Filippini F., Lo Schiavo F., Terzi M., Costantino P. and Trovato M. (1994).** The plant oncogene *rolB* alters binding of auxin to plant cell membranes. *Plant and Cell Physiology*, 35:767-771.
69. **Fincan M., Devito F., Dejmek P. (2004).** Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beet root pigment. *J. of Food Engineering*, 64: 381-388.
70. **Fliniaux O., Mesnard F., Raynaud S., Baltora S., Robins R. J. and Fliniaux M. A. (2001).** Use of heteronuclear multiple bond coherence NMR spectroscopy to minor nitrogen metabolism in a transformed root culture of *Datura stramonium*. *C. R. Acad. Sci. Paris, Chimie/Chemistry*, 4: 775-778.
71. **Freyssinet G., Lebrun M., Pelissier B. and Hardy T. (1993).** Biotechnologies végétales. In Biotechnologies d'aujourd'hui. Julien R. et Cenatiempo Y. *Eds, Limoges*, 163-198.
72. **Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R. and Stitt M. (2006).** Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, 46: 533-548.
73. **Fu C. X., Zhao D. X., Xue X. F., Jin Z. P., Ma F. S. (2005).** Transformation of *Saussurea involucrata* by *Agrobacterium rhizogenes*: Hairy root induction and syringin production. *Process Biochemistry*, 40: 3789-3794.

G

74. **Gamborg O. L., Miller R. A. and Ojima K. (1968).** Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.
75. **Gaudin V., Vrain T. and Jouanin L. (1994).** Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant Physiol. Biochem*, 32: 11-29.
76. **Giri A., Ravindra S. T., Dhingra V., Narasu M. L (2001).** Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy root and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Current Science*, 81, 4: 378-382.
77. **Giri A., Narasu M. N. (2000).** Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.* 18: 1-22.

78. **Goddijn O. J., De Kam R. J., Zanetti A., Schilperoort A., Hoge J. H. C. (1992).** Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharathus roses*. *Plant Mol. Biol.*, 18: 1113-1120.
79. **Gontier E., Piutti S., Gravot A., Milesi S., Grabner A., Massot B., Lièvre K., Tran M., Goergen J. L. and Bourgaud F. (2004).** Development and validation of an efficient low cost bioreactor for furanocoumarin production with *Ruta graveolens* shoot cultures. In: Liquid culture systems for in vitro plant propagation. *Hvoslef-Eide A.K. and Preil W. Eds, Springer ISBN 1-4020-3199-8*, 509-524.)
80. **Gontier E., Clément A., Tran T.L.M., Gravot A., Lièvre K., Guckert A., Bourgaud F. (2002).** Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization : a promising technique for plant secondary metabolite production. *Plant Science*, 1963: 723-732.
81. **Gontier E., Clément A., Bourgaud F. et Guckert A. (1999).** Procédé de production de métabolites à partir de plantes. *Brevets : FR99 14204, EP 00976113.1, PCTFR0003095.*
82. **Gontier E. (2001).** Biotechnologies et valorisation des productions végétales : une démarche de type « génie métabolique » appliquée aux alcaloïdes, aux furanocoumarines et aux triglycérides. *Mémoire de l'Habilitation à Diriger des Recherches, spécialité en Sciences Agronomiques à l'INPL*. 64 p.
83. **Gontier E., Sangwan B.S. et Barbotin J.N. (1994).** Simultaneous determination of some tropane alkaloids by reverse phase HPLC of *Datura innoxia* Mill. Plant material. *Agro-food-industry Hi-tech*, 5: 26-28.
84. **Gontier E. (1993).** Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. cultivé in vitro : impact physiologique de l'immobilisation des cellules au sein d'une matrice d'alginate de calcium. *Thèse de doctorat, Université de Picardie Jules Verne en Biotechnologies Végétales, France*, 165 p.
85. **Gontier E. (1988).** Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill. cultivé in vitro. Essais d'immobilisation au sein d'une matrice d'alginate de calcium. Diplôme d'Etude Approfondies, *Université de Picardie Jules Vernes, Amiens, France*, 35p.
86. **Greenwood D. J., Neeteson J. J. and Draycott A. (1986).** Quantitative relationships for the dependence of growth rate of arable crops on their nitrogen content, dry weight and aerial environment. *Plant Soil*, 91: 281-301.
87. **Guckert A., Morel J. L., Arissian, Herbin S, Blouet A. (1987).** Etude en phytotron d'une association a base d'imazaquin. Deuxième colloque sur les substances de croissance et leurs utilisations en agriculture. ANPP. 11-22.

H

88. **Habib R. (1988).** Quelques réflexions concernant les problèmes de fertilisation en culture irriguées. *Fruits*, 43 : 381-389.
89. **Hakulinen J. (1998).** Nitrogen-induced reduction in leaf phenolic level is not accompanied by increased rust frequency in a compatible willow (*Salix myrsinifolia*) – *Melampsora* rust interaction. *Physiol. Plant.*, 102: 101-110.
90. **Hale A. L., Meepagala K. M., Oliva A., Aliotta G., Duke S. O. (2004).** Phytotoxins from the Leaves of *Ruta graveolens*. *J. Agric. Food Chem.* 52(11): 3345-3349.
91. **Hamel F., Breton C. et Houde M. (1998).** Isolation and characterization of wheat aluminium-regulated genes: possible involvement of aluminium as a pathogenesis response elicitor. *Planta*, 205: 531-538.

92. **Hamill J. D., Robins R. J., Parr A. J. Evans D. M., Furze J. M., Rhodes M. J. C. (1990).** Over-expressing a yeast ornithine decarboxylase gene in transgenic roots of *Nicotiana rustica* can lead to enhanced nicotine accumulation. *Plant Mol Biol*, 15:27-38.
93. **Hamill J. D., Parr A. J., Rhodes M. J. C., Robins R. J., Walton N. J. (1987).** New routes to plant secondary products. *Biotech*, 5: 800-804.
94. **Hansen G. and Wright M. S. (1999).** Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.*, 4 (6): 226-231.
95. **Hara Y., Yoshioka T., Morimoto T., Fujita Y., Yamada Y. (1988).** Enhancement of berberine production in suspension cultures of *Coptis japonica* by gibberelic treatment. *J. Plant Physiol.*, 133, 12: 12-15.
96. **Harssema H. (1977).** Root temperature and growth of young tomato plants. *Wageningen*, 19, p85.
97. **Haseloff J. and Siemering K. R. (1998).** The uses of GFP in plants. In Green Fluorescent Protein. Strategies, Applications and Protocols (Chalfie M. and Kain S. Eds). *New York: Wiley-Liss*: 191-220.
98. **Hashimoto T., Sato F., Mino M. and Yamada Y. (1982).** Production of tropane alkaloids from cultured Solanaceae cells. *Proc. 5th. Int. Cong. Plant Tissue Cell Cult.*, *CRC Press* : 305-306.
99. **Hashimoto T., Masuda J. and Yamada Y. (1993).** Two-step epoxidation of hyoscyamine to scopolamine is catalyzed by bifunctional hyoscyamine 6 β -hydroxylase. *FEBS Letters*, 329: 35-39.
100. **Hashimoto T. Hayashi A., Amano Y., Kohno J. Iwanari H., Usuda S. and Yamada Y. (1991).** Hyoscyamine 6 β -Hydroxyase, an enzyme involved in tropane alkaloid biosynthesis, is localized in the pericycle of the root. *J. Biol. Chem.*, 266, 5: 4648-4653.
101. **Hashimoto T. and Yamada Y. (1986).** Hyoscyamine-6 β -hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent dioxygenase, in alkaloid-producing root culture. *Plant Physiol.*, 81: 619-625.
102. **Heim R., Prasher D. C. and Tsien R. Y. (1994).** Wavelength mutation and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proced. Nat. Acad. Sci. of USA*, 91: 12501-12504.
103. **Herman E. B. (1993).** Recent advances in plant tissue culture II. *Agritech consultants, INC.*, 116p.
104. **Herouart D., Sangwan R. S., Fliniaux M. A. et Sangwan-Norreel B. S. (1988).** Variations in the leaf alkaloid content of androgenic diploid plants of *Datura innoxia*. *Planta Med.*, 1, 94: 14-17.
105. **Herouart D., Gontier E., Sangwan R. S., Fliniaux M. A. et Sangwan-Norreel B. S. (1991).** Analysis of the potential use of Androgenic *Datura innoxia* Mill. for the development of cell cultures producing high amounts of tropane alkaloids. *J. Exp. Bot.*, 42: 1073-1076.
106. **Hille J., Hoekema A., Hooykaas P. and Schilperoort R. A. (1984).** Gene organization of the Ti plasmid. In Genes involved in microbe-plant interactions. Verma D. P. S. and Hohn. *Ed. Vienna*: 287-309.
107. **Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. (1992).** *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.*, 19: 15-38.
108. **Hooykaas P.J.J., Klapwijk P.M., Nuti M.P. (1977).** Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to explants. *J. Gen Microbiol*, 98: 477-484.
109. **Hopkins W.G. (2003).** Assimilation du carbone et productivité. Dans: *Physiologie végétale. Traduction de la 2^{ème} édition américaine par Serge Rambour. Editions De Boeck université*, 515p.

110. **Hromádková Z. and Ebringerová A. (2003).** Ultrasonic extraction of plant materials-investigation of hemicellulose release from buck wheat hulls. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10: 127-133.

J

111. **Jansen B. J. and Gardner R. C. 1989).** Localised transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol Biol.*, 14: 61-72.
112. **Jaziri M., Yoshimatsu K., et Shimomura K. (1999).** Genetic transformation of *Atropa belladonna*. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 45. *Transgenic Medicinal Plants. Ed. Bajaj Y.P.S. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 73-87.*
113. **Jeannequin B., Dosba F., Amiot-Carlin M. J. (2005).** Fruits et légumes, caractéristiques et principaux enjeux. *Publié par l'Institut National de la Recherche Agronomique*, 147, rue de l'Université, 75338 Paris Cedex 07, 114p.
114. **Jefferson R.A. (1987).** Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 5 (4): 387-405.
115. **Juste E., Mary B., Meynard J. M., Machet J. M. and Thelier-Huches L. (1994).** Determination of a critical nitrogen curve for winter wheat crops. *Ann Bot.*, 74: 397-407.

K

116. **Keller H., Hohlfeld H., Wray V., Hahlbrock K., Scheel D. et Strack D. (1996).** Changes in accumulation of soluble and cell wall-bound Phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 42: 389-396.
117. **Kerters K. J., De Ley J. (1984).** Genus *Agrobacterium*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *Krieg N.R. Ed, Baltimore*, P. 244-254.
118. **Kinghorn A. D., Balandrin M. F. (Eds.) (1993).** Human medicinal agents from plants. *Washington: ACS Symposium Series 534.*
119. **Kitamura Y., Miura H. and Sugii M. (1988).** Change of atropine esterase activity in the regenerated plants of *Duboisia myoporoides* during development, and its relation to alkaloid accumulation. *J. Plant Physiol.*, 133: 316-319.
120. **Kitamura Y., Nishimi S., Miura H. and Kinoshita T. (1993).** Phenyllactic acid in *Duboisia leichhardtii* root cultures by feeding of phenyl[1-¹⁴C]alanine. *Phytochemistry*, 34, 2: 425-427.
121. **Knorr D. and Angersbach A. (1998).** Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 9: 185-191.
122. **Komolpis K., Kaufman P.B. et Wang H.Y. (1998).** Chemical permeabilization and *in situ* removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds. *Biotechnol. Techniques*, 12: 697-700.
123. **Kratsch H. A., Graves W. R., Gladon R. J. (2006).** Aeroponic system for control of root-zone atmosphere. *Environmental and Experimental Botany*, 55: 70-76.
124. **Kumar S., Gupta S. K., Singh P., Bajpai P., Gupta M. M., Singh D., Gupta A. K., Ram G., Shasany A.K., Sharma S. (2004).** High yields of artemisinin by multi-harvest of *Artemisia annua* crops. *Industr. Crops and Products*, 19: 77-90.

L

125. **Landgrebe M. E. et Leete E. (1990).** The metabolism of tropinone in intact *Datura innoxia* plants. *Phytochem.*, 29, 8: 2521-2524.
126. **Lanoue A. (2003).** Etude de la biosynthèse et de la production d'alcaloïdes tropaniques par les racines transgéniques de *Datura*. *Thèse de l'Université de Picardie Jules Verne et de l'Université de Genève en Sciences Biologiques en Sciences Biologiques*, 151p.
127. **Lanoue A., Boitel-Conti M., Portais J.C., Barbotin J.N., Christen P. and Sangwan-Norreed B. (2002).** Kinetic study of littorine rearrangement in *Datura innoxia* hairy root by ¹³C NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod.*, 65: 1131-1135.
128. **Le Bot J., Adamowicz S., et Robin P. (1997).** Nutrition minérale chez les herbacées. Un point de vue sur les modèles. Compartimentation et intégration chez les végétaux ligneux. *Compte-rendu du séminaire des 15 et 16 avril 1997*, Montpellier.
129. **Lê Tran Duc (1997).** Cay thuoc va vi thuoc Vietnam. *Nha xuat ban nong nghiep – Hanoi*, 200p.
130. **Lebovka N. I., Bazhal M. I. et Vorobiev E. (2001).** Pulsed electric breakage of cellular tissues: visualisation of percolative properties. *Innovative Food Sci. & Emerging Technol.*, 2: 113-125.
131. **Lee K. T., Yamakawa T., Kodama T., Igarashi Y. and Shimomura K. (1998).** Effets of aeration on tropane alkaloid production by transformed root of *Atropa belladonna* in flask cultures. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86, 6: 614-616.
132. **Leete E., Kowenko N., Newark R. A. (1975).** Use of carbon-13 nuclear magnetic resonance to establish that the biosynthesis of tropic acid involves intramolecular rearrangement of phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.*, 97: 6826-6830.
133. **Leete E. (1990).** Recent developments in the biosynthesis of the tropane alkaloids. *Planta Med.*, 56: 339-352.
134. **Leete E. (1963).** Alkaloid biogenesis – Tropane alkaloids. In “Biogenesis of natural compounds”. *Ed. Bernfeld P., Pergamon press*, 745-746.
135. **Leete E. (1960).** The biogenesis of tropic acid and related studies on the alkaloids of *Datura stramonium*. *J. Am. Chem. Soc.*, 82: 612-614.
136. **Lemaire G., Gastal F. (1997).** N uptake and distribution in plants Canopies. In: Diagnosis of the nitrogen status in crop. In « *Diagnosis of the nitrogen status in crop* » (G. Lemaire, ed.), *Springer-Verlag, Berlin*, 3-43.
137. **Lemaire G., Meynard J. M. (1997).** Use of the nitrogen nutrition index for the analysis of agronomical data. In: « *Diagnosis of the nitrogen status in crop* » (G. Lemaire, ed.), *Springer-Verlag, Berlin*, 45-56.
138. **Léonhart S., Pedneault K., Gosselin A. (2002).** Diversification of greenhouse crop production under supplemental lighting by the use of new cultures with high economic potential. *Acta Hort. 580, ISHS*, 1: 249-254.
139. **Lesaint C., Grandjean M., Gambier J. (1983).** Influence de l'aération du milieu nutritif sur l'absorption de l'eau et des ions, la nuit et le jour. Comparaison du maïs et de la tomate. *C. R. Acad. Agric.*, 6 : 399-406.
140. **Letard M., Erard P., Jannequin B. (1995).** Maîtrise de l'irrigation fertilisation – Tomate sous serre et abris. *Paris* (France), 220p.
141. **Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Huang C. C. and Kain S. R. (1998).** Generation of destabilized enhanced green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem.*, 273: 34970–34975.
142. **Lichtenthaler, H. K. (1987).** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.

143. **Lièvre K. (2004).** Elaboration d'une méthode de transformation génétique de la Rue officinale (*Ruta graveolens* L.) par *Agrobacterium tumefaciens*. Conséquence de l'introduction du gène de la cinnamate-4-hydroxylase sur la voie de biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. *Thèse de Doctorat de l'Institut National de Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques en Sciences Agronomiques*, 181p.
144. **Liu G. M., Fang W. S., Quian J. F., Lan H. (2001).** Distribution of paclitaxel and its congeners in *Taxus mairei*. *Fitoterapia*, 72: 743-746.
145. **Lou Y. and Baldwin I. T. (2004).** Nitrogen supply influences herbivore-induced direct and indirect defense and transcriptional response in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol.* 135: 496-506.
146. **Luo J. and He G.Y. (2004).** Optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensis* in the presence of nutrient feeding. *Process Biochemistry*, 39: 1073-1079.

M

147. **MacKinney G. (1941).** Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 140: 315-322.
148. **Maurel C., Barbier-Brygoo H., Spena A., Tempé J. and Guern J. (1991).** Single *rol* genes from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.*, 97: 212-216.
149. **Maurel C., Leblanc N., Barbier-Brygoo H., Perrot-Rechenmann C., Bouvier-Durand M. and Guern J. (1994).** Alterations of auxin perception in *rolB*-transformed tobacco protoplast. *Plant Physiology*, 105: 1209-1215.
150. **Merle H. Jensen (1997).** Hydroponics. *Hort Science*. 32 (6).
151. **Miraldi E., Masti A., Ferri S., Comparini I. B. (2001).** Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, 72: 644-648.
152. **Morard P. (1995).** Les cultures végétales hors sol. *Publications Agricoles Agen*, 304p.
153. **Moyano E., Jouhikainen k., Tammela P., Palazón J., Cusidó R. M., Piñol M. T., Teeri T. H. et Oksman-Caldentey K. M. (2003).** Effect of *pmt* gene over-expression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *J. Exp. Bot.*, 54: 203-211.
154. **Murashige T. and Skoog F., (1962).** «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures ». *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

N

155. **Nadeem M., Rikhari H. C., Kumar Anil, Palni L. M. S., Nandi S. K. (2002).** Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex. *Phytochemistry*, 60: 627-631.
156. **Nakajima K, Hashimoto T. (1999).** Two tropane reductases that catalyze opposite stereospecific reduction in tropane alkaloid biosynthesis are localized in plant root with different cell-specific patterns. *Plant Cell Physiol*, 40: 1099-1107.
157. **Nakanishi F., Sasaki K., Shimomura K. (2000).** Kinetics of litorine content in various developing stages of regenerates of *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports*, 19: 1021-1026.
158. **Nguyen C. (2003).** Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23: 375-396.

O

159. **Oksman-Caldentley K. M., Vuorela H., Straub A. and Hiltunen R. (1987).** Variation in the tropane alkaloid content of *Hyoscyamus muticus* plants and cell culture clones. *Planta Med*, 6: 394-354.
160. **Olympios C. M. (1975).** Overview of soilless culture: Advantages, constraints and perspectives for its use in Mediterranean countries. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 31: 307-324.
161. **O'Hagan D. et Robins R.J. (1998).** Tropic acid ester biosynthesis in *Datura stramonium* and related species. *Chemic. Soc. Reviews*, 27: 207-212.

P

162. **Palazon J., Moyano E., Cusido R. M., Bonfill M., Oksman-Caldentey K. M. and Pinol M. T. (2003).** Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plant overexpressing the *h6h* gene. *Plant Sci.*, 165: 1289-1295.
163. **Palazon J., Cusido R. M., Roig C., Pinol M. T. (1997).** Effect of *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA on nicotine production in tobacco root cultures. *Plant Physiol. Biochem*, 35, 2: 155:162.
164. **Palazon J., Cusido R. M., Gonzalo J., Bonfill M., Morales C., Pinol M. T. (1998).** Relation between the amount of *rolC* gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharathus roseus* transformed root cultures. *J Plant Physiol*, 153: 712-718.
165. **Palomäki V., Hassinen A., Lemettinen M., Oksanen T., Helmisaari H.S., Holopainen J., Kellomäki S. et Holopainen T. (1998).** Open-top chamber fumigation system for exposure of field grown *Pinus sylvestris* to elevated carbon dioxide and ozone concentration. *Silva Fennica*, 32 : 205-214.
166. **Palomino G, Viveros R, Bye R. A. J. (1988).** Cytology of five Mexican species of *Datura L.* (*Solanaceae*). *Southwest Nat*, 33: 85-90.
167. **Parr A. J., Payne J., Eagles J., Chapman B.T., Robins R. J., Rhodes M. J. C. (1990).** Variation in tropane alkaloid accumulation within the *Solanaceae* and strategies for its exploitation. *Phytochemistry*, 29: 2545-2550.
168. **Parr A. J., Hamill J. D., Rhodes M. J. C., Robin R. J. and Walton V. W. (1988).** Exploiting variation in tropane alkaloid production by Solanaceous plants. In: Manipulating secondary metabolisms in culture, pp 101-107, Robins R. J., Rhodes M. J. C., Eds. *Cambridge Univ. Press.*, Cambridge, UK.
169. **Pathak M. A., Farrington D. J. and Fitzpatrick T. B. (1962).** The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *Journal of investigative Dermatology*, 39: 225-299.
170. **Payne G. F., Bringi V., Prince C. et Shuler M. L. (1991).** Immobilized plant cells, in Payne G. F. Eds, *Plant Cell and Tissue in liquid systems*, Hanser, 179-223.
171. **Pedneault K., Léonhart S. and Gosselin A. (2002).** Variations in Concentration of Active Compounds in Four Hydroponically – and Field-Grown Medicinal Plant Species. *Proc. 4th IS on Artif. Light. Ed. Dorias, Acta Hort*, 580, ISHS 2002.
172. **Pelletier S.W. (1983).** The nature and definition of an alkaloid. In *Alkaloids: chemical and biological perspectives (New York, Wiley)*, p. 1-31.
173. **Petit A., David C., Dahl G.A., Ellis J.G., Guyon P. (1983).** Further extension of opine concept: plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.*, 190: 204-214.

174. **Petit A., Delahaye S., Tempé J. and Morel G. (1970).** Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall. Mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiol. Veg.*, 8: 205.
175. **Pinol M. T., Palazon J., Cusido R. and Serrano M. (1996).** Effects of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* on growth and hyoscyamine production in *Datura stramonium* roots. *Bot Acta.*, 109: 133-138.
176. **Pitta-Alvarez S. I. and Giulietti A. M. (1999).** Influence of chitosan, acetic acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida* effect of medium pH and growth phase. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.*, 59: 31-38.
177. **Plant K. H. and Wagner K. G. (1986).** Determination of Hyoscyamine and Scopolamine in *Datura innoxia* plants by high performance liquid chromatography. *Z. Naturforsch.*, 41c, 391-395.
178. **Portsteffen A., Draeger B., Nahrstedt A. (1994).** The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root culture by two specific reductases. *Phytochemistry*, 37: 391-400.
179. **Poulev A., O'Neal J. M., Logendra S., Pouleva R. B., Timeva V., Garvey A.S., Gleba D., Jenkins I.S., Halpern B.T., Kneer R., Cragg G. M., Raskin I. (2003).** Elicitation, a new window into plant chemidiversity and phytochemical drug discovery. *J. Med. Chem.*, 46: 2542-2547.
180. **Pundarikakshudu K. and Bhavsar G. C. (1989).** Effects of ascorbic acid on the tropane alkaloids of *Datura innoxia* Mill. *Indian Drugs*, 26, 11: 605-609.

R

181. **Raven H., Evert R. F., Eichhorn S. E. (2000).** Biologie végétale. 6^e édition. Traduit par Jules Bouharmont avec la collaboration scientifique de Charles-Marie Evrard. *De Boeck Université - Paris*, 944p.
182. **Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W., Sagen H.E. (1930).** Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agric. Rec.*, 41:387-391
183. **Roberts M. F., Carthy D. Mc., Kutchan M. M. and Coscia C. J. (1983).** Localization of enzymes and alkaloidal metabolites in *Papaver latex*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 222 : 599-609.
184. **Robin R.J., Parr A.J., Payne J., Walton N.J., Rhodes M.J.C. (1990).** Factor regulating tropane alkaloid production in a transformed root culture of *D. candida* x *D. aurea* hybrid. *Planta*, 181: 414-422.
185. **Robin R. J., Woolley J. G., Ansarin M., Eagles J. and Goodfellow B. J. (1994).** Phenyllactic acid but not tropic acid is an intermediate in the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura* and *Brugmansia* transformed root cultures. *Planta* 194: 86-94.
186. **Robin R. J., Parr A. J., Ben E. G., Walton N. J., Rhodes M. J. C. (1991).** Studies on the formation of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root culture, the kinetics of alkaloid production and the influence of feeding intermediate metabolites. *Planta*, 183: 185-195.
187. **Robin R. J. (1998).** The biosynthesis of alkaloids in root culture. In: Alkaloids biochemistry, ecology and medicinal applications (Roberts M.F., Wink M., eds.), *Plenum Press, New York*, 199-218.
188. **Romeike A. (1961).** Sur la biogenèse de la scopolamine. *Bull. Sco. Fr. Phys. Veg.*, 7: 33-35.

S

189. **Sallas L., Kainulainen P., Utriainen J., Holopainen T. et Holopainen J. K. (2001).** The influence of elevated O₃ and CO₂ concentrations on secondary metabolites of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Global Change Biology*, 7: 303-311.
190. **Samia B. (1992).** Influence de la température et de l'aération des racines sur l'absorption des éléments minéraux par la tomate *Lycopersicon esculentum* L. *Mémoire de DEA en Production, Institut National Polytechnique de Toulouse*, France, 40p.
191. **Sato F., Hashimoto T., Hachiya A., Tamura K. I., Choi K. B., Morishige T., Fujimoto H., Yamada Y. (2001).** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (1): 367-372.
192. **Sauerwein M., Shimomura K. (1991).** Alkaloids production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry*, 30: 3277-3280.
193. **Schmeller T. and Wink M. (1998).** Alkaloids in Modern Medicine in Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Edited by Roberts and Wink, Plenum Press, New York*, 477p.
194. **Sevon N., Dragër B., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K. M. (1997).** Characterization of transgenic plants derived from hairy root of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Reports*, 16: 605-611.
195. **Shiao T. L. and Doran P. M. (2000).** Root hairiness: effect on fluid flow and oxygen transfer in hairy root cultures. *Journal of Biotechnology*, 83: 199-210.
196. **Sierra J. (2007).** Etude des mécanismes de croissance des racines *Datura innoxia* : application à la culture en bioréacteur avec divers modes de conduites. *Thèse de doctorat, Université de Technologie Compiègne en Génie des Procédés Industriels*, France, 157 p.
197. **Sim S.J., Chang H.N., Liu J.R. et Jung K.H. (1994).** Production and secretion of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: Effects of *in situ* adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *J. of Ferment. and Bioeng.*, 78: 229-234.
198. **Sinha A. S. et Varma K. C. (1974).** Influence of indole-3-acetic acid on growth and alkaloid content of *Datura innoxia*. *Planta Med.*, 26: 380-384.
199. **Smith E.F., Townsend C.O. (1907).** A plant-tumour of bacterial origin. *Science*, 25: 671-673.
200. **Somssich I. E. et Hahlbrock K. (1998).** Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Elsevier Science Ltd.*, 3: 86-90.
201. **Spollansky T.C., Pitta-Alvarez S.I., Giulietti A.M. (2000).** Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *EJB Electronic J. of Biotechnol.*, 3: 72-75.
202. **Sporer F., Sauerwein M., Wink M. (1993).** Diurnal and developmental variations of alkaloid accumulation in *Atropa belladonna*. *Acta hortic*, 331: 381-386.
203. **Sreevalli Y., Kulkarni R. N., Baskaran K., Chandrashekara R. S. (2004).** Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloids content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization. *Industrial Crops and Products*, 19: 191-195.
204. **Su W. W. (1995).** Bioprocessing technology for plant cell suspension cultures. *Applied Biochem. Biotech*, 50: 189-230.
205. **Subroto M. A., Kwork K. H., Hamill J. D. and Doran P. M. (1996).** Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 481-494.
206. **Szoke E., Dung N. N., Verzar-Petri G. and Potoczki A. (1982).** Change in the total alkaloid contents in the tissue cultures of *Datura innoxia* Mill. In the function of the cultural circumstances. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 29, 3-4: 403-410.

T

207. **Takeda T., Inomata M., Matsuoka H., Hikuma M., Furusaki S. (2003).** Release of anthocyanin from strawberry cultured cells with heating treatment. *Biochem. Engineering j.*, 15: 205-210.
208. **Teglberg R. et Julkunen-Tiitto R. (2001).** Quantitative changes in secondary metabolites of dark-leaves willow (*Salix myrsinifolia*) exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 113: 541-547.
209. **Tempé J. and Goldmann A. (1982).** Occurrence and biosynthesis of opines, p. 428-449. In Kahl G. and Schell J. S. (ed.). Molecular biology of plant tumors. *Academic Press, Inc., Orlando, Fla.*
210. **Tepfer D. and Tempé J. (1991).** Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souches A4. *C. R. Acad. Sci., 292, série III* : 153-156.
211. **Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Narayan M. S., Ravishankar G. A. (2003).** Kinetics of pigment release from hairy root culture of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress. *Process Biochem.*, 38: 1069-1076.
212. **Tindall J. A., Mills H. A., Radcliffe D. E. (1990).** The effect of root zone temperature on nutrient uptake of tomato. *Journ. of plant nutritio.*, 13 (8): 939-956.
213. **Tran T.L.M., Vu T. D., Mignard B., Biteau F., Fèvre J.P., Boitel-Conti M., Guckert A., Bui C.T., Bourgaud F., Gontier E. (2006).** Hydroponics as a model technology for producing plant root secondary metabolites. *Workshop "Biotechnology in Agriculture"*, 20-21 November 2006 in Hochiminh city, Vietnam.
214. **Tran T.L.M. (2005).** Synthèse et accumulation d'alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en hydroponie : analyse des effets de l'environnement biotique et abiotique ; essais de mise en place d'une nouvelle technologie de production. *Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques*, France, 105 p.

V

215. **Van De Velde H. (1988).** Hyoscyamine and scopolamine production in *Datura stramonium* var. Tatuala. *Acta Agronomica Hungarica*, 37: 51-63.
216. **Van Der Werf A., Van Nuenen M., Visser A. J. and Lambers H. (1993).** Effects of N-supply on the rates of photosynthesis and shoot and root respiration of inherently fast- and slow- growing monocotyledonous species. *Physiol. Plant.*, 89 : 563-569.
217. **Vancanniet G., Schmidt R., O'connor-Sanchez A., Willmitzer L. and Rocha-Sosa (1990).** Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early stage events in *Agrobacterium* mediated plant transformation. *Mol Gen.*, 220: 245-250.
218. **Vasconsuelo A., Giuliotti A.M., Boland R. (2004).** Signal transduction event mediating chitosan stimulation of anthraquinone synthesis in *Rubia tinctorium*. *Plant Science*, 166: 405-413.
219. **Veena V., Taylor C. G. (2007).** *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 43: 383-403.
220. **Veluthambi K., Krishnan M., J. H. Gould, R. H. Smith and Gelvin S. B. (1989).** Opines Stimulate Induction of the *vir* Genes of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti Plasmid. *Journal of Bacteriology*, 171, 7: 3696-3703.

221. **Verpoorte R. (2000).** Pharmacognosy in the new Millennium: Lead finding and Biotechnology. *J. Pharm. Pharmacol*, 52: 253-262.
222. **Verpoorte R., Van der Heijden R. Ten Hoopen H. J. G., Memelink J. (1999).** Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett*, 21: 467-479.
223. **Verpoorte R., Van der Heijden R., Van Gulik W. M. and H. J. G. (1991).** Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. *Brossi A. (ed) The alkaloids, Academic Press, San Diego*, 40: 1-187.
224. **Verzar Petri G. (1973).** Histochemical and historadiographic examination of alkaloid localization in the vegetative organs of *Datura innoxia* Mill. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 18: 257-271.
225. **Verzar Petri G. and Huynh D. (1977).** Formation of the alkaloid content and composition of *Datura innoxia* Mill. during sprouting. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 47:37-44.
226. **Viña S. Z., Olivera D. F., Marani C. M., Ferreyra R. M., Mugridge A., Chaves A. R., Mascheroni R. H. (2007).** Quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. *gemmifera* DC) as affected by blanching method. *Journal of Food Engineering*, 80: 218-225.
227. **Vu T. D., Tran T. L. M., Mignard B., Biteau F, Heinrich S., Hassani L., Bourgaud F. et Gontier E. (2006).** Modélisation de la croissance et de la production d'alcaloïdes tropaniques de *Datura innoxia* Mill. cultivé en hydroponie ; évaluation de l'effet de l'intensité d'éclairage sur le développement de la plante et la biosynthèse d'hyoscyamine et de scopolamine. *Séminaire de l'école doctorale RP3E « Ingénierie des ressources, Procédé, Produit et Environnement »*. ISBN2-9518564-4-X.
228. **Vu T. D., Tran T. L. M., Biteau F., Mignard B., Fèvre J. P., Guckert A., Bourgaud F. and Gontier E. (2006).** Improvement of secondary metabolites production in hydroponic cultures by Mechanical and biological processes. *Workshop "Biotechnology in Agriculture"*, 20-21 November 2006 in Hochiminh city, Vietnam.
229. **Vu T. D. (2003).** Effet de la disponibilité en nitrate de la solution nutritive sur la croissance et le statut azoté du Choysum (*Brassica rapa* var Choysum). *Mémoire de DEA en Sciences Agronomique, Institut National Polytechnique de Lorraine*, France, 25p.

W

230. **Waller G. P. and Nowacki E. R. (1978).** Alkaloid biology and metabolism in plants. *New York Plenum*.
231. **Wang Y. C., Zhang H. X., Zhao B., Yuan X. F. (2001).** Improved growth of *Artemisia annua* L. hairy root and artemisinin production under red light conditions. *Biochemol. Lett*, 23: 1971-1973.
232. **Wijrsekera R.O.B. (1991).** The Medicinal plant industry. *CRC Press, Inc. ISBN 0-8493-6669-0*, 269p.
233. **Wink M. (1998b).** Modes of action of alkaloids. In: *Alkaloids : Biochemistry, ecology and medicinal applications (Roberts M. F., Wink M., eds.)*, Plenum Press, New York : 301-326.
234. **Wink M. and Witte L. (1994).** Turnover and transport of quinolizidine alkaloids: diurnal variation of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. *Planta*, 161: 519-521.
235. **Wu J., Lin L. et Chau F.T. (2001).** Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 347-352.

Y

236. **Yamada Y. and Fujita Y. (1986).** Production of useful compounds from culture. In: Handbook of Plant Cell Culture (*Evans D. A., Sharp W. R., Ammirator P. V., Yamada Y., eds.*), Macmillan Co., New-York: 717-728.
237. **Yankoulov Y. (1979).** Morphogenetic alkaloid concentration variability in tetraploid thornapple. *Genetics and Plant Breeding*, 12, 6: 416-422.

Z

238. **Zabetakis I., Edwards R., et O'Hagan D. (1999).** Elicitation of tropane alkaloid biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 50: 53-56.
239. **Zambryski P. (1992).** Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 465-490.
240. **Zambryski P.C., Tempe J. and Schell J. (1989).** Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell*, 56: 193-201.
241. **Zehra M., Banerjee S., Naqvi A. A., Kumar S. (1998).** Variation in the growth and alkaloid production capability of the hairy roots of *Hyoscyamus albus*, *H. muticus* and their somatic hybrid. *Plant Science*, 136: 93-99.
242. **Zhao J., Zhu W. H., Hu Q. et Guo Y. Q. (2000).** Improvement of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell cultures by osmotic shock. *Biotechnology Let.*, 22 : 1227-1231.
243. **Zobel A. M. and Brown S. A. (1990).** Dermatitis-inducing furanocoumarins on leaf surfaces of eight species of Rutaceous and Umelliferous plants. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 3: 693-700.
244. **Zobel A. M. and Brown S. A. (1988 b).** Determination of furanocoumarins on the leaf surface of *Ruta graveolens* with an improved extraction technique. *J. Nat. Prod*, 51: 941-946.
245. **Zobel A. M. and Brown S. A. (1988 a).** Histological localization of furanocoumarins in *Ruta graveolens* shoot. *Can. J. Bot*, 67: 915-921.

LISTE DE FIGURES - PLANCHES - TABLEAUX

Figures

Figure 1a : Evolution de la hauteur des plantes cultivées en immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

Figure 1b : Evolution du diamètre des tiges de daturas cultivés en immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

Figure 2a : Evolution du nombre de feuilles de plantes cultivées en immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

Figure 2b: Evolution de la longueur maximale apparente des racines de plantes cultivées immersion permanente (conditions standard) et en immersion temporaire.

Figure 3: Evolution de la biomasse de plantes (A : matière fraîche, B : matière sèche) au cours du temps. La mesure a été réalisée par pesées répétées de 3 radeaux de culture contenant 18 plantes. Les valeurs présentées ici sont divisées par 18 et indiquent donc (après retrait de la tare) la masse fraîche moyenne des plantes.

Figure 4: Evolution du rapport entre la masse sèche des parties racinaires (PR) et la biomasse des parties aériennes (PA) au cours de la culture des plantes en immersion permanente ou temporaire.

Figure 5a : Teneur en hyoscyamine (H) dans les parties aériennes (PA) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

Figure 5b: Teneur en hyoscyamine (H) dans les parties racinaires (PR) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

Figure 6a: Teneur en scopolamine (S) dans les parties aériennes (PA) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

Figure 6b : Teneur en scopolamine (S) dans les parties racinaires (PR) de plantes cultivées en immersion permanente et en immersion temporaire.

Figure 7a : Teneur en H&S dans les plantes entières au bout de 7 semaines de culture en immersion temporaire et en immersion permanente.

Figure 7b: Quantité totale d'alcaloïdes dans les plantes entières au bout de 7 semaines de culture en immersion temporaire et en immersion permanente.

Figure 8 : Evolution de la hauteur des plantes (a) et de la longueur maximale des racines (b) au cours du temps.

Figure 9 : Surface foliaire (a) et nombre de feuilles (b) de plantes cultivées sous différentes intensités de lumière après 22 jours de culture.

Figure 10 : Evolution de la biomasse fraîche (a) et sèche (b) des plantes au cours du temps.

Figure 11: Teneur en hyoscyamine dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'intensité de la lumière.

Figure 12 : Teneur en scopolamine dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'intensité de la lumière.

Figure 13a : Teneur en H&S dans la plante en fonction de l'intensité de la lumière.

Figure 13b : Productivité des alcaloïdes dans les plantes au bout de 3 semaines de culture.

Figure 15 (a-d) : Evolution des paramètres de croissance de plantes de 8 semaines en fonction du spectre lumineux (a: hauteur - b: diamètre des tiges - c: nombre de feuilles - d: surface foliaire).

Figure 16 : Biomasse fraîche (a) et sèche (b) des plantes cultivées depuis 8 semaines sous lumière orange et lumière blanche.

Figures 17: Teneur en H&S dans les organes de la plante sous deux modalités lumière artificielle, (a) : parties aériennes, (b) : parties racinaires.

Figure 18a: Teneur en H&S dans la plante entière au bout de 8 semaines de culture sous deux modalités lumière artificielle.

Figure 18b : Quantité d'alcaloïdes dans les plantes au bout de 8 semaines.

Figure 19 : Teneur en chlorophylle a&b dans les feuilles de plantes depuis 8 semaines de culture sous deux modalités lumière artificielle.

Figure 20: Evolution de la température de l'air dans la serre chauffée (modalités A&B) : température minimale (T minimum), maximale (T maximum), entre midi et quatorze heures (12-14h) et moyenne de minimale et maximale (T moyenne).

Figure 21 : Evolution de la température de l'air dans la serre froide (modalités C&D).

Figure 22a : Somme de température de l'air des serres = f(t).

Figure 22b : Somme de température des solutions nutritives = f(t).

Figure 23 : Evolution de la température des solutions nutritives pour les 4 modalités testées: A=serchaulu, B=serchau, C=serfroi, D=serfroisolchau.

Figure 24a : Hauteur de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

Figure 24b: Diamètre des tiges de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

Figure 25a: Nombre de feuilles de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

Figure 25b : Surface foliaire de plantes au cours du temps sur quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

Figure 26a : Biomasse fraîche de plantes au cours du temps pour quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

Figure 26b: Masse sèche de plantes au cours du temps pour quatre modalités de culture (A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

Figure 27: Biomasse moyenne des plantes en fonction de la somme des températures de la serre (Modalités: A=serchau, B=serchaulu, C=serfroi, D=serfroisolchau).

Figure 28: Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramification (E) et volume total (F) des racines de plantes cultivées depuis 35 jours en bac hydroponique sous différentes conditions d'environnement (modalitéA: serchau, modalitéB:serchaulu, modalitéC:serfroi, modalitéD:serfroisolchau).

Figure 29: Teneur en H&S dans la plante après 4 (a) et 7 semaines (b) de culture.

Figure 30: Quantité de H&S dans la plante au bout de 4 (a) et 7 semaines (b) de culture.

Figure 31: Evolution de la microflore dans les solutions nutritives au cours du temps de culture des plantes sous différentes conditions environnementales; modalité A : serchau, modalité B : serchaulu, modalité C : serfroi, modalitéD : serfroisolchau).

Figure 32: Vitesses moyennes de dégradation des alcaloïdes tropaniques, H&S, par la microflore dans les milieux de culture. Courbes établies ici sur la base de valeurs moyennes intégrant tous les prélèvements effectués au cours de la culture hydroponique.

Figure 33: Evolution de la demi-vie de H&S en fonction du temps de culture des plantes en hydroponie. Ces courbes sont établies à partir des valeurs de demi-vie déterminées graphiquement sur chaque cinétique établie à chaque semaine de culture des plantes.

Figure 34a: Effet du pH sur l'évolution de la conductivité de la solution nutritive au cours du temps de culture de daturas hydroponiques.

Figure 34b: Effet du pH sur la longueur maximale des racines au cours du temps de culture de daturas hydroponiques.

Figure 35 : Evolution de la hauteur des plantes et de leur nombre de feuilles en fonction du pH de la solution nutritive.

Figure 36: Evolution de la biomasse des plantes : MF (a) et MS (b) en fonction du pH de la solution nutritive.

Figure 36: Evolution de la teneur en H (a) et S (b) dans la plante en fonction du pH de la solution nutritive.

Figure 37a: Effet du pH des milieux sur la teneur en H&S dans la plante au bout de 5 semaines de culture.

Figure 37b : Effet du pH des milieux sur la productivité de H&S dans la plante au bout de 5 semaines de culture.

Figure 38: Evolution de la hauteur des plantes en fonction de la concentration en nitrate du milieu nutritif.

Figure 39: Evolution du nombre de feuilles en fonction de la concentration en nitrate du milieu nutritif.

Figure 40: Surface foliaire des plantes (cm²/plante) à 21 et 45 jours de culture en fonction de la concentration en nitrate du milieu nutritif.

Figure 41: Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramifications (E) et volume total (F) des racines de plantes cultivées depuis 21 et 45 jours en bac hydroponique sous différentes concentration en nitrate du milieu nutritif.

Figure 42: Evolution de la biomasse fraîche (a) et sèche (b) des plantes hydroponiques en fonction de l'apport azoté.

Figure 43: Masse sèche des plantes au bout de 45 jours de culture en fonction de la disponibilité en nitrate du milieu de culture.

Figure 44: Teneur en azote total dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

Figure 45: Taux carbone/azote (total) dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de la plante en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

Figure 46: Teneur en H&S dans la plante en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

Figure 47 : Corrélation entre le ratio C/N et leur teneur en alcaloïdes de la matière sèche des plantes de 45 jours de culture.

Figure 48: Teneur en H&S des plantes âgées 45 jours (a) et leur production (b) en fonction de l'apport azoté dans du milieu de culture.

Figure 49 : Surface foliaire totale des plantes au bout de 3 semaines de culture avec ou sans apport d'agrobactéries dans la solution nutritive.

Figure 50 : Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramification (E) et volume totale (F) des racines mesurés après 3 semaines de culture sur des plantes en hydroponie, avec ou sans apport d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Figure 51: Effet de l'apport de différentes souches d'agrobactéries (TR7, 11325, 15834, TR107) sur la production de biomasse fraîche au cours du temps.

Figure 52: Masse fraîche et sèche des plantes au bout de 5 semaines de culture après apport de différentes souches d'agrobactéries (TR7, 11325, 15834, TR107).

Figure 53: Effet des souches d'*A. rhizogenes* sur la teneur en H&S dans les plantes au bout de 35 jours de culture.

Figure 54: Effet des souches d'*A. rhizogenes* sur la quantité d'alcaloïdes dans les plantes au bout de 35 jours de culture.

Figure 55: Evolution de la conductivité et de la température des solutions nutritives durant la croissance de *Datura innoxia* Mill. cultivés en pilotes hydroponiques avec ou sans apport initial d'*Agrobacterium rhizogenes* TR7 (ArTR7).

Figure 56 : Evolution de la hauteur des plantes (a) et de leur nombre de feuilles (b) au cours d'une culture hydroponique pilote réalisée avec ou sans apport d'agrobactéries (souche TR7).

Figure 57: Surface foliaire de plantes cultivées en pilote hydroponique avec (traitement TR7) ou sans inoculation par *A. rhizogenes* TR7 (témoin); mesures réalisées au bout de 3 semaines de culture).

Figure 58: Evolution de la longueur maximale apparente des racines de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec (traitement TR7) ou sans inoculation par *A. rhizogenes* TR7 (témoin).

Figure 59: Longueur (A), surface (B), diamètre (C), nombre d'apex (D), nombre de ramification (E) et volume total (F) des racines de plantes cultivées depuis 21 jours en pilote hydroponique avec ou sans inoculation par *A. rhizogenes* TR7.

Figure 60 : Evolution de la biomasse racinaire de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec (traitement TR7) ou sans (témoins) inoculation par *A. rhizogenes* TR7: (a) biomasse fraîche, (b) biomasse sèche.

Figure 61: Teneur en hyoscyamine dans les parties aériennes (Aa) et parties racinaires (Bb) de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec "traitement TR7" ou sans ajout d'agrobactéries "témoins".

Figure 62: Teneur en scopolamine dans les parties aériennes (A) et parties racinaires (B) de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec "traitement TR7" ou sans ajout d'agrobactéries "témoins".

Figure 63: Teneur en H&S dans la plante entière au cours de la culture en pilotes hydroponiques avec ou sans ajout d'agrobactéries (respectivement "traitement TR7" et "témoins").

Figure 64 : Productivité en H&S dans la plante entière au cours de la culture en pilotes hydroponiques avec ou sans ajout d'agrobactéries (respectivement "traitement TR7" et "témoins").

Figure 65 : Evolution du nombre de microorganismes dans la SN de plantes cultivées en pilotes hydroponiques avec (B) ou sans (A) ajout d'ArTR7; le dénombrement sur boîte de Pétri est effectué après 24h ou 48h d'incubation à 28°C. Le résultat est exprimé en UFC/ml.

Figure 66: Evolution de la hauteur (a) et du nombre de feuilles (b) des plantes cultivées après inoculation des différentes souches d'*A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) dans la solution nutritive.

Figure 67: Evolution de la masse fraîche (a) et la masse sèche (b) des plantes cultivées sans (témoin) ou après ajout de différentes souches d'*A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) dans la solution nutritive.

Figure 68: Teneur en H&S dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de plantes inoculées avec différentes souches de *A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) à 21 jours de culture.

Figure 69: Teneur en H&S dans les parties aériennes (a) et racinaires (b) de plantes inoculées avec différentes souches de *A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) à 35 jours de culture.

Figure 70: Teneur globale en H&S (ensemble de la plante) mesurée sur des cultures hydroponiques inoculées avec différentes souches de *A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*) à 21 et 35 jours de culture.

Figure 71: Quantité de H&S dans des plantes hydroponiques après 21 et 35 jours de culture. Les solutions nutritives ont été inoculées avec différentes souches (sauvage, *egfp* et *gus*) de *A. rhizogenes* TR7. Le témoin n'a pas été inoculé.

Figure 72: Quantité de microorganismes dans la solution nutritive de plantes hydroponiques cultivées avec ou sans (témoin) ajout initial d'*A. rhizogenes* TR7 (sauvage, *egfp* et *gus*). Le dénombrement des colonies formées sur boîtes de Pétri est effectué après 24h d'incubation (a) et 48h (b) pour visualiser les microorganismes à croissance rapide et ceux dont la croissance est plus lente (*i.e.* *A. rhizogenes* TR7).

Figure 73: Cinétique moyenne de dégradation de l'hyoscyamine ((Aa) et de la scopolamine (Bb) dans la solution nutritive de cultures hydroponiques de plantes réalisées avec ou sans apport de différentes souches d'agrobactéries [témoin *versus* *A. rhizogenes* TR7 (sauvage ou *egfp* ou *gus*)].

Figure 74: Temps de demi-vie moyenne de l'hyoscyamine (Aa) et de la scopolamine (Bb) dans la solution nutritive de cultures hydroponiques de plantes réalisées avec ou sans apport de différentes souches d'agrobactéries [témoin *versus* *A. rhizogenes* TR7 (sauvage ou *egfp* ou *gus*)].

Figure 75: Hauteur et nombre de feuilles (a), diamètre des tiges et longueur maximale des racines (b) de plantes cultivées depuis 4 semaines en hydroponie stérile, non stérile ou stérile-contaminée.

Figure 76: Masse fraîche et masse sèche de plantes cultivées depuis 4 semaines en hydroponie stérile, non stérile ou stérile-contaminée.

Figure 77 : Effet de la présence de microorganismes sur la teneur en hyoscyamine et scopolamine dans les parties aériennes et racinaires de plantes cultivées en hydroponie depuis 4 semaines de culture.

Figure 78: Teneurs moyennes en H&S dans les plantes cultivées en hydroponie depuis 4 semaines de culture.

Figure 79: Evolution de la concentration en hyoscyamine (a) ou en scopolamine (b) ajoutées dans la solution nutritive stérile de plantes hydroponiques.

Figure 80: Concentration en H&S dans des plantes hydroponiques stériles, avant (T0), ou, 24H après ajout d'hyoscyamine (T24h+H) ou de scopolamine (T24h+S) dans la solution nutritive.

Figure 81 : Quantité de H&S dans des plantes hydroponiques stériles avant (T0) ou 24h après d'addition de 100mg/L d'hyoscyamine (T24h+H) ou de scopolamine (T24h+S). (A) quantité exprimée en mg/g de matière fraîche et (B) en mg/plante.

Figure 82 : Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur la hauteur (b) et le nombre de feuilles (b) de la plante hydroponiques; (sté) plantes stériles; (stéAr) plantes stériles co-cultivées avec *A. rhizogenes*; (nonstéAr) plantes stériles recontaminées avec les microorganismes d'une culture hydroponique non-stérile issue de serre et co-cultivées avec *A. rhizogenes* (nonsté) plantes stériles cultivées en présence de microorganismes provenant d'une culture hydroponique non-stérile issue de serre.

Figure 83: Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur les paramètres de croissance racinaire de plantes hydroponiques soit (a) diamètre des tiges et (b) surface foliaire.

Figure 84 : Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur les paramètres de croissance racinaires des plantes hydroponiques.

Figure 85 : Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur la biomasse des plantes hydroponiques.

Figure 86: Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur l'accumulation de H&S dans les organes de la plante.

Figure 87: Effet combiné d'*A. rhizogenes* 11325 et d'une microflore "complexe" sur la production de H&S dans les organes de la plante.

Figure 88: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de 50µM d'acétosyringone sur la hauteur (A) et la surface foliaire (B) des plantes.

Figure 89: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de 50µM d'acétosyringone sur la biomasse des plantes: (A) biomasse fraîche; (B) matière sèche.

Figure 90: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de 50µM d'acétosyringone sur la teneur en hyoscyamine (A) et en scopolamine (B) dans les organes de la plante.

Figure 91: Effet combiné d'*A. rhizogenes* TR7 et de 50µM d'acétosyringone sur la quantité de H&S accumulée dans les organes de la plante.

Figure 92 : Quantité de biomasse fraîche de racines de daturas produites à partir de 8 bouts de racines après 16 jours en culture liquide.

Figure 93: Contenu en H&S (hyoscyamine et scopolamine) de racines de daturas hydroponiques stériles (témoins) et de racines simplement (TR7sauvage) ou doublement transformées (TR7-*egfp* ou TR7-*gus*) obtenues à l'issue de la co-culture de plantes hydroponiques stériles avec les différentes souches d'*A. rhizogenes*.

Planches

Planche 1: Structure de la molécule d'hyoscyamine, de scopolamine et du noyau tropanique.

Planche 2: synthèse de l'hyoscyamine et la scopolamine (repris de Déchaux-Duval, 2005- d'après Robins, 1998).

Planche 3: *Datura innoxia* Mill. (A) et ses organes : bouton floral et fleur (B); fruit et graines (C); racines (D).

Planche 4 : Schéma de culture hydroponique non stérile en bac et en pilote (repris de Tran, 2005).

Planche 5 : Schéma de culture aéroponique (repris de Tran, 2005) et les racines de *Datura innoxia* cultivées dans ce système.

Planche 6 : Schéma des plasmides pTDE4 (A) et pPE113 (B).

Planche 7 : Le spectre électromagnétique de la lumière orange (A) et de la lumière blanche (B); les radiations visibles ou lumière, représentent une partie du spectre électromagnétique total.

Planche Planche 7b : Germination de graines de *Datura innoxia* sur milieu gélosé depuis un mois.(source personnelle)

Planche Planche 8 : Germination de graines de *Datura innoxia* sur les cubes de laine de roche (a)Planche et sur du mélange sable/terreau (b) depuis 3 semaines.(source personnelle)

Planche Planche 9 : Dispositif développé dans cette thèse pour la réalisation de culture hydroponique stérile (à gauche) et une culture individuelle de datura bien fermée depuis 4 semaines (à droite).

Planche Planche 10 : Racines issues de plantes stériles (a) et de plantes non stériles (b) vues observées au à la loupe binoculaire après 3 jours d'inoculation.

(source

personnelle)

Planche 11 : Contrôle microbiologique par étalement de solutions nutritives sur milieu gélosé TSA en boîte de Pétri. La visualisation et le dénombrement des colonies est effectuée après 72h d'incubation à 28°C. Ce test permet de vérifier soit, (a) la présence unique d'*Agrobacterium rhizogenes* inoculé au cours de culture, soit (b), la présence d'*Agrobacterium rhizogenes* et celle de microorganismes issus d'une contamination fortuite (flèches).

(source personnelle) Planche 12 : Culture hydroponique en bac PVC (a) et en système pilote (b). (source personnelle)

Planche 13 : Schéma de du dispositif d'hydroponie en immersion temporaire.

Planche 14 : Racines de *Datura innoxia* en culture hydroponique dans le système pilote. (source d'équipe)

Planche 15 : Spectre CPG de la solution standard contenant de l'homatropine, de l'hyoscyamine et de la scopolamine à 100mg/L.

Planche 16 : Spectre CLHP de la solution standard contenant de la scopolamine, de l'homatropine et de l'hyoscyamine à 10 mg/L.

Planche 17: Schéma du dispositif expérimental mis en œuvre pour tester l'effet d'un renforcement de la lumière naturelle par une lumière artificielle à différentes intensités d'éclairage pour une même durée de "sur-illumination" ; (hauteurs des lampes par rapport à la surface de l'eau: modalité I, II, III, et IV; hauteur 120, 100, 70 et 50 cm, respectivement).

Planche 18 : Culture de *Datura innoxia* (2 semaines) en hydroponie sous différentes intensités de lumières.

Planche 19: *Datura innoxia* cultivés en bac pendant 8 semaines sous lumière orange (a : lampes à vapeur de sodium) et sous lumière blanche (b : lampes à vapeur de mercure).

Planche 20 : Racines de *Datura innoxia* cultivés en bac pendant 8 semaines sous lumière orange (a : lampes à vapeur de sodium) et sous lumière blanche (b : lampes à vapeur de mercure).

Planche 21: Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la réalisation de cultures hydroponiques selon 4 modalités (A,B,C,D) dans deux serres: une serre "chaude" (A,B) et une "froide" (C,D) avec supplément de lumière pour la modalité (A) et chauffage de la solution nutritive à 20°C par bain marie pour la modalité (D). Trois bacs de cultures regroupant 15 plantes chacun sont numérotés 1, 2 ou 3 et constituent chaque modalité.

Planche 22 : Dispositif de culture utilisé en serre pour tester l'effet combiné de la température et de la lumière selon 4 modalités: plantes de modalité A (serchau), Modalité B (serchaulu), Modalité C (serfroi) et modalité D (serfroisolchau) au bout de 4 semaines de culture.

Planche 23: Analyse microscopique de la diversité des colonies microbiennes présentes dans le milieu de culture hydroponique et poussant sur le milieu TSA (grandissement X100).

Planche 24: Racines de plantes cultivées depuis 45 jours avec différentes concentrations en nitrate.

Planche 25: Racines de *Datura innoxia* après 15 jours de culture en système hydroponique pilote: (A) culture témoin, (B) culture inoculée avec *ArTR7*.

Planche 26: Racines des plantes témoins (A) et des plantes co-cultivées (B) avec *A. rhizogenes TR7-egfp* au bout de 4 semaines en hydroponie.

Planche 27: racines de plantes "*ArTR7-egfp*" (A) et "*ArTR7-gus*" (B) après trois semaines de culture hydroponique en serre. Observations au microscope à fluorescence (A) et sous loupe binoculaire après incubation avec le substrat X-gluc (B).

Planche 28 : Culture de *Datura innoxia* Mill. en hydroponie stérile après 4 semaines de culture.

Planche 29: Populations microbiennes présentes dans la solution nutritive de cultures contaminées ponctuellement (a) et de cultures non-stériles (b). On constate une plus grande diversité des colonies microbiennes dans le second cas.

Planche 30: Racines de plantes cultivées en système hydroponique stérile depuis 4 semaines: (a, a1) racines stériles, (b, b1) racines d'une culture stérile ayant été inoculée avec une microflore issue de culture hydroponique non stérile en serre ; a1 et b1 sous la loupe binoculaire.

Planche 31: Schéma de répartition de la concentration en hyoscyamine (masse par unité de volume: mg/ml) entre le "compartiment solution nutritive" (milieu) et le "compartiment racinaire" (racines) à 24h après ajout de 100mg/L de H dans le milieu.

Planche 32: Schéma récapitulatif décrivant l'hypothèse de fonctionnement des daturas en culture hydroponique non stérile. L'hyoscyamine (H) et la scopolamine (S) sont successivement synthétisées dans les racines à partir d'ornithine (O) et phénylalanine ou d'acide phényllactique (P). Une partie de H&S est libérée dans la solution nutritive par diffusion passive. Les microorganismes présents dans la solution nutritive dégradent une partie des alcaloïdes ce qui amoindrit la réabsorption active ou facilité. Une partie des alcaloïdes synthétisés dans les racines est transportée et accumulée

dans les parties aériennes. Au cours de cette translocation, la conversion de l'hyoscyamine en scopolamine est poursuivie et, au final, le ratio S/H des feuilles est supérieur à celui des racines.

Planche 33: Feuilles, parties aériennes et racines de plantes hydroponique stériles témoin (a) et inoculées avec *A. rhizogenes* (b), cultivées depuis 6 semaines.

Planche 34 : Dispositif de culture hydroponique stérile utilisé pour tester l'effet d'*Agrobacterium* (vue au 10^{ème} jour de culture).

Planche 35: Systèmes racinaires de *Datura innoxia* cultivés en hydroponie stérile et inoculés par *A. rhizogenes*; (a) racines témoins, (b) racines infectées avec la souche TR7 sauvage, (c) racines infectées avec TR7-*egfp* et (d) racines infectées avec TR7-*gus* après 25 jours de culture.

Planche 36 : Racines de *D. innoxia* observées sous microscope à fluorescence avec le filtre GFP (excitation à 488nm): (a) racine contrôle, (b) racine présentant une fluorescence verte due à la présence de EGFP (racine putativement transformée), (c) et (d) localisation cellulaire de la fluorescence vue à plus fort grossissement.

Planche 37: Racines de *D. innoxia* présentant une couleur bleue due à la métabolisation de X-Gluc par l'enzyme β -glucuronidase (racines potentiellement transformées): (a) racines issues de culture hydroponique conduite en présence de *ArTR7-gus* révélant un phénotype chimérique visible à la loupe binoculaire ; (b) racine témoin non transformée et (c) racine potentiellement transformée par le gène *gus*, incubé en présence du substrat X-Gluc et observée sous microscope.

Planche 38 : Observation de racines issues de plantes cultivées en conditions hydroponiques sur milieu sélectif solide (MS/2-30) additionné de céfotaxime (300mg/L) et dépourvu phytohormone.

(a) : racines témoins ; (b),(c) et (d) : racines inoculées avec *A. rhizogenes* TR7 sauvage, *A. rhizogenes* TR7-*egfp* et *A. rhizogenes* TR7-*gus* à t0 ; e : racines témoins à t8 jours ; (f), (g) et (h) : racines inoculées avec *A. rhizogenes* TR7 sauvage, *A. rhizogenes* TR7-*egfp* et *A. rhizogenes* TR7-*gus* à t8 jours.

Planche 39: Gels d'électrophorèse des produits d'amplification PCR des gènes *rol A* (contenu dans le plasmide pRi TR7) et *vir A* (sur le plasmide Ri *A. rhizogenes* TR7 sauvage) dans des échantillons d'ADN de différentes lignées racinaires.

Planche 40 : Gels de migration des produits de PCR obtenus pour les gènes *rol A* (Plasmide pRi TR7), *egfp* (Plasmide pPE113) et *vir A* (Plasmide Ri d'*A. rhizogenes* TR7 sauvage) présents dans des échantillons d'ADN extraits de différentes cultures racinaires.

Planche 41 : Gels de migration des produits de PCR obtenus pour les gènes *rol A* (dans le plasmide pRi TR7), *gus* (dans le plasmide pTDE4) et *vir A* (plasmide Ri d'*A. rhizogenes* TR7 sauvage) présents dans des échantillons d'ADN extraits de différentes cultures racinaires.

Planche 42: Culture de racines en milieu liquide B5-30 (sans antibiotique et dépourvu de phytohormone) : observation faites après 16 jours de culture de 8 bouts de racines (1,5-2 cm). a: racines infectées TR7 sauvage, b) TR7-*egfp* et c) TR7-*gus*.

Tableaux

Tableau 2: Nombre de métabolites secondaires connus recensés dans « Dictionary of natural products » (d'après Verpoorte et Alfermann, 2000, repris de Chapman et Hall, 1998).

Tableau 2: Liste non exhaustive d'agents phytochimiques importants et de plantes médicinales utilisés en médecine moderne (Wijrsekera, 1991 repris de Tran, 2005).

Tableau 3: Exemples de traitements ayant permis de stimuler la production de MII dans la biomasse végétale de cellules ou organes cultivés *in vitro*.

Tableau 4: Exemples de traitements de cellules ou d'organes végétaux *in vitro* ayant permis la libération de métabolites secondaires dans le milieu de culture.

Tableau 5 : Récapitulatif des souches bactériennes utilisées, de leurs milieux de culture et de leurs antibiotiques de sélection.

Tableau 6: comparaison de la température (°C) moyenne des solutions nutritives (test de Newman-Keuls, seuil $\alpha=5\%$).

Tableau 7 : Récapitulatif de l'effet de la disponibilité en NO₃ de la solution nutritive sur la croissance de biomasse, la teneur en N total, rapport C/N teneur en H&S et leur production dans la plante à 45 jours de culture.

Tableau 8: Récapitulatif des résultats obtenus par observation des lignées racinaires sous microscope à fluorescence et suite aux analyses moléculaires faites par PCR.

Tableau 9: Récapitulatif des résultats de tests histochimiques et d'analyse PCR obtenus sur les différentes lignées racinaires.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition pour le milieu YMB

(Yeast Mannitol Broth) (Subba Rao, 1977)

Composition du milieu :

1.1 Eléments	Quantité (g/L)
K ₂ HPO ₄ , 4H ₂ O	0.655
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.200
NaCl	0.100
D-mannitol	10
Extrait de levures	4

Préparation de milieu solide :

2 Après mélange des différents composants du milieu YMB, le volume est complété jusqu'à 1L. 12g d'agar sont ensuite ajoutés et le milieu est autoclavé (barème de stérilisation : 120°C pendant 20 min). Après refroidissement mais avant solidification du milieu, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri, sous hotte à flux laminaire.

Annexe 2 : Composition du milieu TSA (Tryptic Soy Agar)

Pour un litre de milieu :

TSA : 4g

Agar: 12g

pH 7

Annexe 3: Milieu de Murashige et Skoog (MS) (Murashige et Skoog, 1962)

Composition de la solution nutritive utilisée pour la culture de *Datura innoxia* Mill. Cette solution nutritive regroupe les minéraux du milieu de culture *in vitro* de MS.

	mg/L
Macroéléments	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Microéléments	
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Fer	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3

Milieus dérivés :

Milieu de germination pour avoir les plantules stériles :

Pour un litre de milieu solide : 100mL de la solution MS (1x) ; 0,10g de saccharose ; 8g d'agar sont ajoutés ; le volume est ensuite complété jusqu'à 1L et le pH est ajusté à 5,8 avec du KOH. 30mL sont distribués par chaque pot bébé avant autoclavage (barème de stérilisation : 120°C pendant 20 minutes).

Milieu de culture de plantes stérile :

Un litre de solution MS (1X) est placé en bouteille de culture avant d'être stérilisé à l'autoclave. Après refroidissement du milieu, 9,81mg (50µmol) d'Acétosyringone (dilué dans de l'eau distillée, filtré) sont ajoutés stérilement dans certains cas.

Milieu de culture de racines : MS/2 30

Composés	g/L
MS préparé (Kalys)	2,2
Saccharose	30
Agar	8
Céfotaxim	0,3

Après mélange des différents composants de ce milieu, le volume est complété jusqu'à 1L à pH 5,8 en utilisant KOH. Après l'autoclavage, 300mg de bactériostatique céfotaxime filtrés sur filtre 0,2µm sont ajoutés lorsque la température du milieu est inférieure à 65°C ce qui évite leur dégradation.

Annexe 4: Composition ionique (meq/L) des solutions nutritives utilisées pour la disponibilité de nitrate (milieu Adatom)

meq l ⁻¹	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	Σcations
K ⁺	-	1.0	2.0	3.0
Ca ²⁺	0.125	-	6.875	7.0
Mg ²⁺	-	-	3.0	3.0
Σanions	0.125	1.0	11.875	13.0

meq l ⁻¹	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	Σcations
K ⁺	-	1.0	2.0	3.0
Ca ²⁺	0.2	-	6.8	7.0
Mg ²⁺	-	-	3.0	3.0
Σanions	0.2	1.0	11.8	13.0

meq l ⁻¹	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	Σcations
K ⁺	-	1.0	2.0	3.0
Ca ²⁺	0.3	-	-	7.0
Mg ²⁺	-	-	3.0	3.0
Σanions	0.3	1.0	11.7	13.0

meq l ⁻¹	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	Σcations
K ⁺	-	1.0	2.0	3.0
Ca ²⁺	3.0	-	4.0	7.0
Mg ²⁺	-	-	3.0	3.0
Σanions	3.0	1.0	9.0	13.0

meq l ⁻¹	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	Σcations
K ⁺	-	1.0	2.0	3.0
Ca ²⁺	7.0	-	-	7.0
Mg ²⁺	-	-	3.0	3.0
Σanions	7.0	1.0	5.0	13.0

meq l ⁻¹	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ²⁻	Σcations
K ⁺	1.0	1.0	2.0	4.0
Ca ²⁺	12.2	-	-	12.2
Mg ²⁺	1.8	-	3.0	4.8
Σanions	15.0	1.0	5.0	21.0

meq l ⁻¹	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	Σcations
NH ₄ ⁺	20.6	-	-	-	20.6
K ⁺	18.8	-	-	1.25	20.05
Ca ²⁺	-	6	-	-	6
Mg ²⁺	-	-	3	-	3
Σanions	39.4	6	3	1.25	49.65

Solution d'oligo-élément équivalente de produit Kanieltra commercial pour 375mL de solution mère (cette solution diluer à 0,3mL/L)

Composés	PM (g)	mM	à peser en g
MoO ₃	143,94	2,81	0,051
MnCl ₂ , 4H ₂ O	197,91	116,49	2,882
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	287,54	32,43	1,166
CuSO ₄ , 5H ₂ O	249,68	4,72	0,147
H ₃ BO ₃	61,83	206,27	1,594
FeSO ₄	278,02	107,44	3,734
Na ₂ EDTA	372,24	160	7,445

Attention : Toutes les caractéristiques ont été calculées pour un pH de 5,0 (ramener les pH entre 4,9 et 5,1 par H₂SO₄ 0,1N).

Dissoudre les sels séparément. N'introduire le phosphate et les oligoéléments qu'en dernier dans le bac pour éviter une précipitation lorsqu'il est presque plein.

Annexe 5: Composition du milieu B5 et milieux dérivés

Solution stocks (Gamborg *et al.*, 1968) :

	Composé chimique	Concentration finale dans le milieu de culture 1x (μM)	Solution stock (g)
Macro éléments	KNO ₃	24,5.10 ³	25
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	1.10 ³	1,5
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1.10 ³	2,5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10.10 ³	1,32
	NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	6.10 ³	0,95
Micro éléments	H ₃ BO ₃	50	0,3
	MnSO ₄ . H ₂ O	45	1
	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	7	0,2
	Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	1	0,025
	KI	4,5	0,075
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,1	0,0025
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,05	0,00125
Fe-EDTA	Na-EDTA	100	3,73
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	100	2,78
Vitamines	Myo-inositol	1,11.10 ³	10
	Acide nicotinique	8	0,100
	Pyridoxine HCl	4,2	0,100
	Thiamine HCl	30	1

Milieu dérive liquide de repiquage des racines après obtention (B5-30)

Pour un litre de milieu solide :

- Macro 1x, soit 100mL
- Micro 1x, soit 10mL
- Fe-EDTA 1x, soit 10mL
- Vitamines B5 1x, soit 10mL

Après ajout de 3% de saccharose, le volume est complété jusqu'à 1L et le pH est ajusté à 5,8 avec KOH. Le milieu est placé dans les tubes ou les Erlenmeyers de culture avant d'être stérilisé à l'autoclave (barème de stérilisation : 120°C pendant 20 minutes).

Annexe 6 : Modification de méthode d'extraction des alcaloïdes tropaniques dans la biomasse pour le CPG

L'objectif de cette ce travail est de tenter de raccourcir la durée d'extraction de H&S de la matière sèche de *Datura innoxia*.

Description de la méthode :

Dans un premier temps, l'extraction des alcaloïdes tropaniques s'est faite suivant une méthode standard. Cette méthode est satisfaisante, les extraits sont suffisamment propres pour le CPG, mais la durée d'extraction est trop longue. La méthode proposée est développée afin de raccourcir le temps de préparation de l'extrait.

Le sacrifice des plantes est une opération rapide. Les plantes prélevées sont séparées en deux catégories d'organes : partie aérienne et partie racinaire. Ensuite, elles sont immédiatement séchées, soit dans une étuve à 80°C pendant deux ou trois jours, ou dans un lyophilisateur après une congélation. Enfin les matières sèches des échantillons sont broyées à l'aide d'un broyeur à bille.

Méthode standard :

100 mg de matière sèche broyée sont passées au Vortex 3 fois pendant 10 minutes avec 5 mL d'HCl 0,1N. 200 µL d'homatropine 250 mg/L sont ajoutées à l'HCl 0,1N pour servir d'étalon interne. La solution est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 4000 rpm. Le surnageant est repassé au Vortex 3 fois, dont chacune dure 30 secondes avec 4 mL de chloroforme additionné de NH₄OH (28%) jusqu'à pH supérieur à 9 de façon à laisser les alcaloïdes migrer dans la phase chloroformique. Et puis la solution est centrifugée encore une fois comme sus-mentionné. La phase chloroformique est évaporée, enfin repris dans 1 mL de chloroforme pour l'injection en CPG.

Méthode modifiée :

La procédure d'extraction des échantillons est effectuée selon des étapes ci-dessus (comme la méthode standard) mais la phase chloroformique n'est pas évaporée. Elle est injectée directement en CPG.

Le témoin est HHS (homatropine, hyoscyamine et scopolamine) à la concentration 100 mg/L.

Résultats

Pour pouvoir analyser les résultats, la moyenne et l'écart type du contenu des 3 répétitions sont calculées pour chaque partie : partie aérienne et partie racinaire.

Nous pouvons constater que la teneur en hyoscyamine et en scopolamine trouvée dans la matière sèche de chaque organe de la plante avec les deux méthodes d'extraction, standard et proposée, n'a pas

de différence significative (figure 1). Par contre, la méthode proposée nous permet de gagner 15 à 20 minutes de préparation de l'extrait pour chaque échantillon dans le cas d'évaporation avec l'évaporateur, et 3h pour plusieurs échantillons avec le dispositif Speed vac.

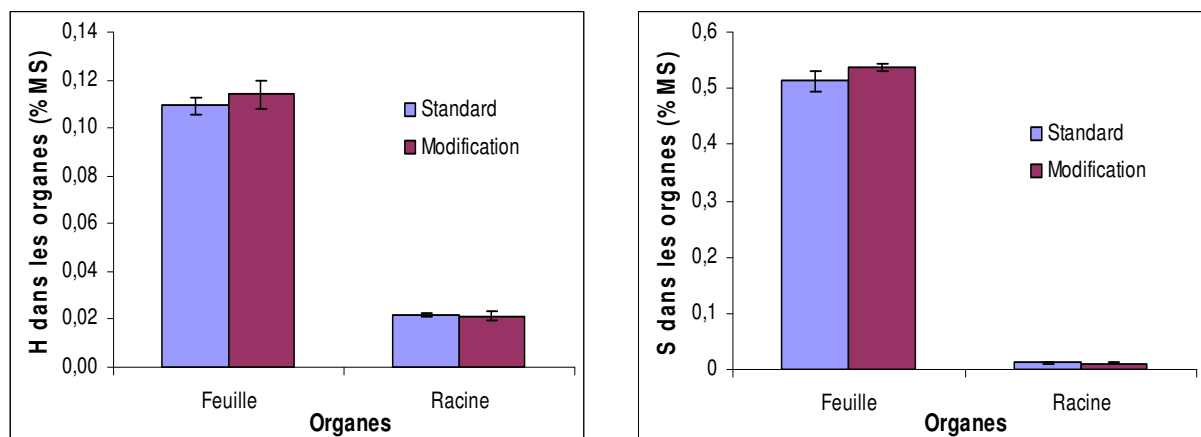


Figure 1 : Teneur en hyoscyamine et scopolamine dans les feuilles et dans les racines appliquée deux façons de préparer les échantillons.

Conclusion :

La méthode d'extraction des alcaloïdes tropaniques (hyoscyamine et scopolamine) selon la méthode proposée donne les mêmes résultats que la méthode standard, mais permet le gain du temps de préparation des extraits. On peut donc s'en servir pour les analyses ultérieures.

Annexe 7 : Méthode d'extraction des alcaloïdes tropaniques dans la biomasse pour le CLHP

L'objectif de ce travail est de tenter de raccourcir la durée d'extraction de H&S à partir de la matière sèche de *Datura innoxia*, de diminuer l'utilisation de la quantité du solvant et de récolter la plus grande quantité possible d'alcaloïdes.

Pour les travaux de l'équipe « Datura » du laboratoire Androgenèse et Biotechnologie de l'Université Jules Verne Picardie, l'extraction des alcaloïdes tropaniques pour doser au CLHP s'est faite suivant une méthode standard (Dechaux-Duval, 2005). Cette méthode est satisfaisante, les extraits sont suffisamment propres pour le CLHP mais la durée d'extraction est trop longue et il y a une grande utilisation de solvant organique. C'est pourquoi nous cherchons une nouvelle méthode.

Description de la méthode proposée

L'extraction commune des molécules hyoscyamine et scopolamine de la matière sèche se fait à l'aide de la solution mélangée acide chlorhydrique - éthanol. Pour cela, la poudre sèche finement broyée (30 mg) est pesée dans un tube « Eppendorf » de 2 mL auquel on ajoute un volume de 1,5 mL de solvant d'extraction, selon sept modalités de proportion entre l'acide chlorhydrique (0,1N) et l'éthanol (90%) comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Modalités	HCl 0,1N	Ethanol 95%
1	0	100
2	50	50
3	60	40
4	70	30
5	80	20
6	90	10
7	100	0

Ce mélange est passé au Vortex trois fois une minute, soit au total trois minutes de forte agitation, puis centrifugé à 14000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, la phase de surnageant est injectée directement dans le CLHP après récupération par un filtre RC 0,2µm. Les résultats sont présentés dans la figure 2 (pour la partie aérienne) et dans la figure 3 (pour la partie racinaire).

Nous avons constaté que l'hyoscyamine et la scopolamine sont facilement extraits et se retrouvent dans la solution. Nous remarquons que la teneur en hyoscyamine et en scopolamine dans la matière sèche de chaque organe de la plante avec les deux méthodes d'extraction, standard et proposée, n'a pas de différence significative. Par contre, la méthode proposée nous permet de gagner le temps de préparation de l'extrait pour chaque échantillon de la méthode classique.

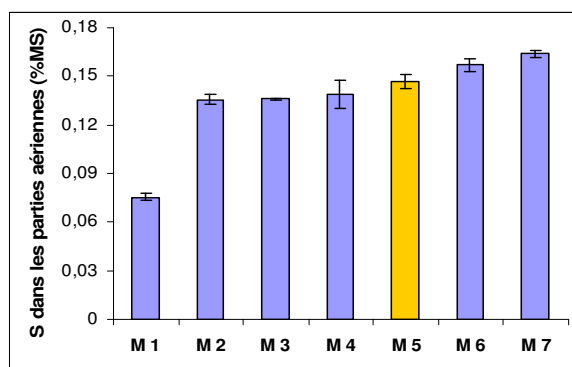
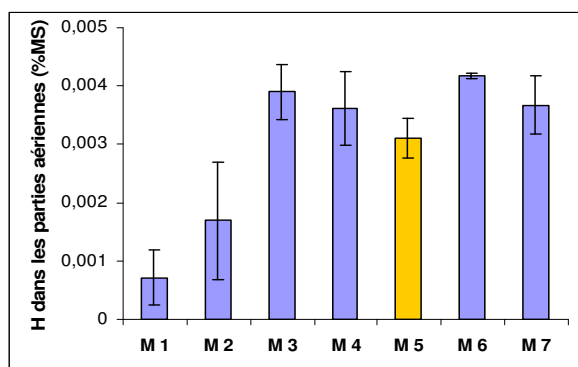


Figure 2: Teneur H&S dans les parties aériennes avec 7 modalités d'extractions différentes.

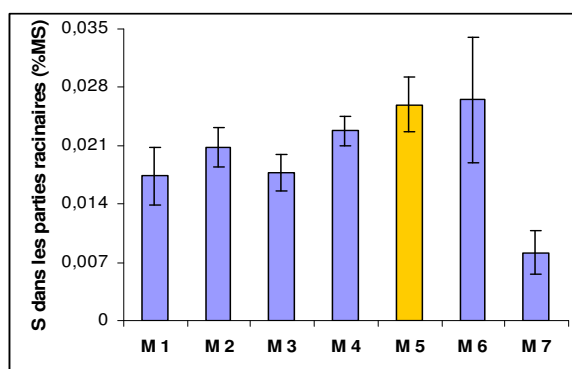
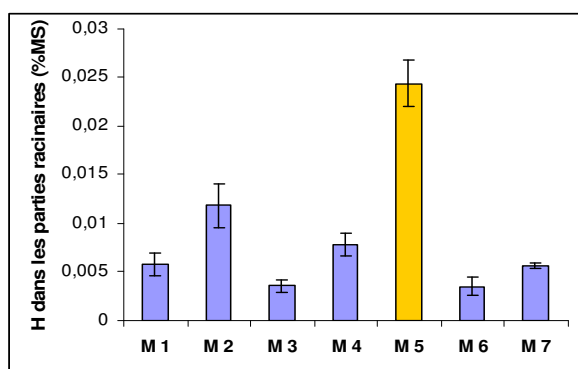


Figure 3 : Teneur H&S dans les parties racinaires avec 7 modalités d'extractions différentes.

Méthode classique

L'extraction et la purification sont basées sur les propriétés amphotères des alcaloïdes tropaniques : à pH basique, ils sont solubles dans les solvants organiques et à pH acide, ils sont dans la phase aqueuse. La procédure d'extraction et de purification se compose de 2 étapes :

1^{ère} étape : l'extraction

100 mg de matière sèche broyée en poudre sont placées dans 100 mL de solvant d'extraction constituée de méthanol : chloroforme (1 :1) à pH basique (>9, ajusté avec de l'ammoniaque 28%). L'ensemble est placé sur une table d'agitation pendant une nuit, de façon à laisser les molécules migrer dans le solvant. Le lendemain, les échantillons sont filtrés et évaporés à chaud (60°C) sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

2^{ème} étape : la purification

L'échantillon évaporé est ensuite repris dans 30 mL d'acide chlorhydrique HCl 0,1N. Cette solution acide est placée dans une ampoule à décanter, avec 30 mL de chloroforme pur et quelques gouttes d'ammoniaque 28% de manière à ramener le pH au-dessus de 9. Ce mélange est agité fortement (en prenant bien soin de dégazer l'ampoule, l'ammoniaque formant des gaz) pour permettre le passage des alcaloïdes de la phase aqueuse vers la phase organique. Cette dernière est récupérée dans un ballon de 100 mL. Ces étapes sont répétées 3 fois afin de récolter la plus grande quantité possible d'alcaloïdes. L'ensemble des trois derniers est mélangés et évaporés. Les trois étapes de purification réalisées, les alcaloïdes sont solubilisés dans 4 mL d'éluant et l'échantillon est filtré sur un filtre de diamètre 0,2µm avant de l'injecter dans la CLHP.

Comparaison de la méthode d'extraction proposée (M5) avec la méthode d'extraction classique

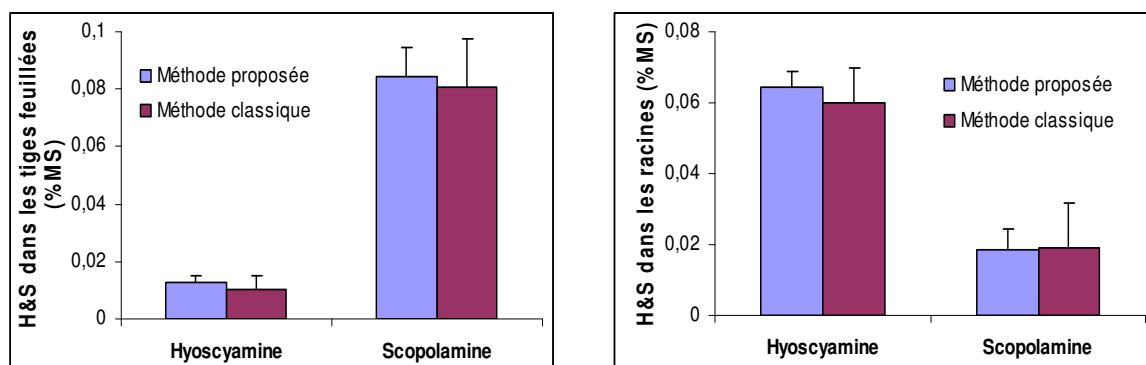


Figure 4 : Teneur en H&S dans les organes avec deux méthodes d'extraction appliquée.

Résultats

Pour pouvoir analyser les résultats, la moyenne et l'écart type du contenu des 3 répétitions sont calculées pour chaque modalités et chaque partie de la plante: partie aérienne et partie racinaire.

Nous pouvons constater que la teneur en hyoscyamine et la teneur en scopolamine dans la matière sèche de chaque organe de la plante, partie aérienne et partie racinaire, avec les deux méthodes d'extraction, standard et proposée, n'ont pas de différence significative (figure 4). Mais la méthode proposée nous permet une meilleure récupération d'alcaloïdes et gagner beaucoup de temps de préparation de l'extrait. Nous avons éradiqué (totalement supprimé) l'utilisation de 100 mL de solvant (mélange entre la chloroforme et la méthanol) et 90 mL d'acide chlorhydrique 0,1N pour chaque échantillon.

Conclusion :

La méthode d'extraction des alcaloïdes tropaniques (H&S) selon la méthode proposée donne de meilleurs résultats que la méthode standard et permet le gain du temps de préparation des extraits. En plus, on ne doit pas utiliser une grande quantité de solvant organique. Cette méthode va donc contribuer à diminuer le coût d'analyse et à protéger l'environnement. On peut donc s'en servir pour les analyses ultérieures.

Annexe 8: Relevé de luminosité dans la serre de culture durant l'expérience avec quatre modalités de lumière (§2, chapitre I).

L'expérience de culture sous les quatre modalités d'éclairages différents :

Intensité I: 118,67 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, intensité II: 144,87 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Intensité III: 151,07 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, intensité IV: 189,09 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$

La luminosité a été mesurée par un capteur PAR (Rayonnement Photosynthèse Actif) pendant deux jours (quatre fois pour le jour soleilleux et trois fois pour le jour nuageux).

Jour soleilleux 15/03/05	Intensité IV	Intensité III	Intensité II	Intensité I	Lumière naturelle sans d'éclairage
9h10	320,9	444,9	476,1	279,5	163,0
	319,0	433,6	452,3	205,9	145,4
	341,6	355,8	478,6	248,8	158,2
13h30	648,3	620,1	587,5	539,9	283,9
	600,6	563,7	552,8	674,3	298,3
	610,5	555,1	581,1	589,8	324,1
18h10	197,3	82,39	71,55	45,33	46,3
	167,4	97,57	69,38	56,37	44,6
	184,4	91,07	49,87	56,37	37,7
20h30 (nuit)	199,5	75,9	67,25	32,54	Il fait nuit
	165,3	84,6	60,74	43,38	
	180,1	84,6	43,38	45,55	

Moyenne	327,91	290,78	290,88	234,81	166,83
Jour nuageux 20/03/05					
9h10	182,2	99,79	97,62	73,76	39,4
	138,8	108,4	91,11	84,6	47,2
	141,0	101,9	71,59	75,93	44,9
13h30	260,3	249,6	256,1	171,4	56,5
	236,4	243,1	251,7	204,6	50,3
	216,9	218,5	253,7	219,1	65,8
18h10	199,5	106,3	95,45	71,59	Il fait nuit
	175,7	121,4	106,3	82,43	
	151,0	110,6	80,28	84,6	
Moyenne	189,09	151,07	144,87	118,67	50,72

Annexe 9 : Tableau récapitulatif des mesures de l'intensité lumineuse pour la modalité B (§4, chapitre I)

L'intensité lumineuse apportée par les lampes est mesurée par un Portable Photosynthèse System, LI-6200 Primer (LI-Cor Inc). Elle est mesurée à 10h avec et sans lumière renforcée à 40-50cm de bac, 10 répétitions. La différence entre les deux moyennes de l'intensité lumineuse montre un apport de lumière de $105 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

	Sans apport de lumière artificielle	Avec apport de lumière artificielle
Intensité lumineuse en photons : $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (mesurée à 10h)	123	245
	119	221
	117	245
	121	266
	125	225
	182	250
	173	262
	188	295
	180	284
	165	250
Moyenne en $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	149,3	254,3
Apport de lumière artificielle en $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	105	

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles scientifiques

R. Amdoun, L. Khelifi, M. Khelifi-Slaoui, S. Amroune¹, E.H. Benyoussef, **Dao Vu Thi** and E. Gontier. Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: modelization of the *in vitro* biochemical response. Article soumis à la revue "Plant Science" en 2008.

Communications nationales et internationales par voie d'affiche

T.D. Vu, T.L.M. Tran, F. Biteau, B. Mignard, A. Guckert, F. Bourgaud et E. Gontier (2007). Production d'alcaloïdes tropaniques chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en hydroponie; effets du développement de microorganismes dans la solution nutritive sur l'accumulation d'hyoscyamine et de scopolamine. Poster numéro 41 du séminaire de l'école doctorale RP2E « Ingénierie des ressources, Procédé, Produit et Environnement ». ISBN 2-9518564-5-8.

T.D. Vu, T.L.M. Tran, R. Nasri, F. Biteau, B. Mignard, J.P. Fèvre, A. Guckert, F. Bourgaud and E. Gontier (2007). Plant secondary metabolites production: hydroponic cultures for harvesting root phytochemicals. PSE Congress, poster in "Plants for human health" in the post genomic ERA ", 26-29 August 2007 in Helsinki, Finland.

T.D. Vu, T.L.M. Tran, F. Biteau, B. Mignard, S. Heinrich, L. Hassani, F. Bourgaud et E. Gontier (2006). Modélisation de la croissance et de la production d'alcaloïdes tropaniques de *Datura innoxia* Mill. cultivé en hydroponie; évaluation de l'effet de l'intensité d'éclairage sur le développement de la plante et la biosynthèse d'hyoscyamine et de scopolamine. Poster numéro 41 du séminaire de l'école doctorale RP2E « Ingénierie des ressources, Procédé, Produit et Environnement ». ISBN2-9518564-4-X.

Trần Thị Lê Minh, **Vũ Thị Đào**, Mignard Benoît, Biteau Flore, Fèvre Jean-Paul, Boitel Conti Michèle, Guckert Armand, Bui Cách Tuyên, Bourgaud Frédéric, Gontier Eric (2006). Plant milking technology for the production of secondary metabolites. Workshop international "Biotechnology in Agriculture", 20-21 November 2006 in Hochiminh city, Vietnam.

T.D. Vu, T.L.M. Tran, F. Biteau, B. Mignard, J.P. Fèvre, A. Guckert, F. Bourgaud et E. Gontier (2006). Mechanical and biological processes for the improvement of secondary metabolites production in hydroponic cultures. Workshop international "Biotechnology in Agriculture", 20-21 November 2006 in Hochiminh city, Vietnam.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Michèle BOITEL-CONTI, Maître de Conférences, Faculté des Sciences, Amiens
Madame Dominique LAURAIN-MATTAR, Professeur, UHP, Vandoeuvre-lès-Nancy

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame VU Thi Dao

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires
chez *Datura innoxia* Mill. cultivé en conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et
abiotiques"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Sciences agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 24 juin 2008

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX