

Influence de l'acétosyringone et du glucose sur l'induction des chevelus racinaires par *Agrobacterium rhizogenes* chez *Zygophyllum album* L.

Induction des chevelus racinaires chez Zygophyllum album L.

SAHLI Fatiha^{a,*} ; GADIRI Mohamed Nassim^a ; AYADI Radia^b

^a Institut National De Recherche Forestière (INRF). Bp 37 chéraga - Bainem. Alger

^b Université Saïd Dahleb - Département sciences Agronomiques - Blida.

* Auteur correspondant : SALHI F.

Email : fatyhasahly@yahoo.fr

Résumé :

Zygophyllum album est une *Zygophyllaceae* présentant des propriétés médicinales importantes vu les métabolites secondaires qu'elle renferme. La production de ces derniers par les chevelus racinaires, induits par la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, pourrait être prometteuse par rapport aux autres techniques de production (culture en plein champs...etc). L'étude de l'influence de l'acétosyringone et du glucose sur l'induction des CRs sur des explants de *Z. album* montre que le glucose rajouté à la suspension bactérienne augmente la formation de cals, le nombre des racines par explant et améliore la précocité d'apparition des racines ; par contre l'addition de l'acétosyringone a un effet contraire. Cependant l'effet de l'interaction du couple [acétosyringone – glucose] améliore la précocité d'apparition des racines et le nombre des CRs induits.

Mots-clés: Acétosyringone ; *Agrobacterium rhizogenes* ; chevelus racinaires ; glucose ; *Zygophyllum album*

Abstract

Zygophyllum album is a *Zygophyllaceae* with important medicinal properties due to the secondary metabolites it contains. The production of these by the hairy roots, induced by the bacterium *Agrobacterium rhizogenes*, could be promising compared to other production techniques (open field cultivation ... etc). The study of the influence of acetosyringone and glucose on the induction of CRs on explants of *Z. album* shows that the glucose added to the bacterial suspension increases callus formation, the number of roots by explant and improves the early appearance of the roots; on the other hand, the addition of acetosyringone has a contrary effect. However, the effect of the interaction of the pair [acetosyringone - glucose] improves the early appearance of the roots and the number of CRs induced.

Key words : Acetosyringone; *Agrobacterium rhizogenes*; hairy roots; glucose; *Zygophyllum album*

1. Introduction

En Algérie, les espèces spontanées des régions arides et semi-arides constituent une importante ressource naturelle de métabolites secondaires. Parmi ces espèces, *Zygophyllum album* est une plante halophyte particulièrement connue comme

antidiabétique, anti-oxydante, antimicrobienne et cytotoxique (Meng et al., 2002 ; Ayad, 2010 ; Megdiche-Ksouri et al., 2013). Cette espèce biosynthétise divers métabolites secondaires parmi lesquels : les alcaloïdes β -carboline et les flavonoïdes (Moustafa et al., 2007).

Beaucoup de métabolites secondaires sont synthétisés au niveau des racines (Flores et al., 1999). La possibilité de les produire par voie biotechnologique à partir de chevelus racinaires (CRs), obtenus par transformation génétique à l'aide de la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, est une approche prometteuse (Kim et al., 2002 ; Verpoorte et Memelink, 2002 ; Barakat Makhzoum, 2007 ; Srivastara et Srivastara, 2007 ; Chandra et Chandra, 2011 ; Tian, 2015, Shao et Qiu, 2019).

Agrobacterium rhizogenes est une bactérie du sol qui infecte les plantes au niveau des blessures. Le mécanisme d'infection de la plante par *A. rhizogenes* se fait en trois étapes : adhésion bactérie – plante ; activation des gènes de virulence vir puis transfert et intégration de l'ADN-T dans le génome de la cellule hôte (Tepfer, 1982 ; Scriban, 1999, Bhagat et al., 2019). Lors de l'infection, les gènes vir d'*A. rhizogenes* sont activés par des signaux chimiques provenant de la plante blessée parmi lesquels les composés phénoliques tel que l'acétosyringone ; les monosaccharides et le pH acide (Lee et al., 1996 ; Gelvin, 2003 ; Tzfira et al., 2004). La réaction de la plante à l'infection se traduit par la formation d'une tumeur sous forme de CRs caractérisés par une croissance rapide et un rendement élevé en métabolites secondaires (Souret et al., 2003 ; Kovalenko et Maliuta, 2003, Gholami et al., 2019).

L'objectif de ce travail est l'étude de l'influence de l'acétosyringone et du glucose sur l'induction des CRs par la souche A4 d'*A. rhizogenes* chez *Z. album* L.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Obtention de vitro semis de *Z. album*

Les graines de *Z. album* ont été récoltées dans la région de Béchar dans le Sahara algérien. Elles sont désinfectées à l'éthanol à 96° pendant 20 secondes puis à l'hypochlorite de sodium 12° pendant 10 minutes. Après trois rinçages à l'eau distillée stérilisée, elles sont mises en germination dans des tubes à essai contenant environ 20 ml de milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) additionné de 7

g/l d'agar et 20 g/l de sucre. Le pH du milieu est ajusté à 5,8. Ces graines sont placées dans une chambre de culture à une température de 25±1°C et une photopériode de 16 heures de lumière / 8 heures d'obscurité. L'intensité lumineuse est de 3500 ± 80 lux.

2.2. Suspension bactérienne de la souche A4

La souche A4 utilisée est originaire de Californie (Etats-Unis). Elle est conservée à l'obscurité à une température de -4°C et dans le milieu solide YEM (Yeast Extract Mannitol). L'activation de la bactérie consiste à l'ensemencer sur le milieu YEM solide de pH 7 puis mise en incubation à l'obscurité à une température de 27 ± 1°C pendant 48 heures. Les bactéries obtenues après activation sont remises en suspension dans le milieu YEM liquide et laissées en incubation à 27°C sur agitateur (à 90 rpm) pendant 24 h à l'obscurité avant l'infection (Amdoun, 2010).

2.3. Infection et co-culture plante-bactérie

L'infection se fait par simple dépôt à l'aide d'une seringue contenant la suspension bactérienne au niveau des explants de tiges. Pour induire les CRs, 11 expériences de différentes combinaisons à savoir : 5 concentrations (niveaux) d'acétosyringone et 5 concentrations de glucose sont réalisées selon le plan d'expérience *Central Composit Design* (section 2.5). Les concentrations de l'acétosyringone utilisées sont : 1,3 - 5 - 30 - 55 et 59 µM. Pour le glucose, les différents niveaux sont : 8,5 - 10 - 20 - 30 et 31,5 g/l. Les concentrations testées ont été choisies selon la littérature consultée.

Les fragments de tiges de 4 à 5 mm de hauteur sont prélevés sur les vitrosemis de *Z. album* âgés de 8 semaines. Ils sont ensuite déposés, selon une polarité inversée, à raison de 5 explants par boîte de Pétri, sur milieu solide MS auquel on a additionné 0,25 g/l céfotaxime (antibiotique) afin d'éliminer la bactérie (Amdoun, 2010). La co-culture est réalisée à l'obscurité à une température de 26 ± 1°C.

Quatre réponses seront mesurées :

- le taux de réactivité ($Y_{Réac}$) : exprimé en pourcentage du nombre d'explants ayant formé un cal,
- le taux d'induction ($Y_{Ind.}$) : exprimé en pourcentage du nombre d'explants ayant formé au moins une racine,
- le temps moyen d'apparition de la première racine (Y_{Temps}),
- le nombre moyen de racines par explant (Y_{NMRE}).

2.4. Isolement, sélection et caractérisation des racines induites

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

Les racines qui présentent une forte croissance sont retenues, alors que celles qui sont calogènes ou qui présentent une faible croissance sont systématiquement éliminées.

2.5. Plan d'expérience et traitement statistique

La méthode des plans d'expériences permet d'obtenir le maximum de renseignements avec le minimum d'essais (Box *et al.* 2005). Le plan d'expérience retenu est le Central Composit Design (CCD). Ce plan comporte trois parties: un plan factoriel 2^k ($k=2$), un plan en étoile ($-\alpha = -1,14$ et $+\alpha = 1,14$) choisi par rapport au critère et le centre du plan : Chaque point (E1 à E11) correspond à une expérience (Figure 1). Le calcul des concentrations qui optimisent les réponses est réalisé à partir de chaque modèle obtenu.

L'ANOVA (Fisher Test) a été utilisé pour une évaluation globale des modèles. Les tests à 5% de risque ont été considérés comme significatifs. Le coefficient de détermination R^2 est pris en compte. Il représente le rapport de la variance suggérée par le modèle mathématique par rapport à la variance globale et varie de 0 à 1. Le graphique de Paréto sera également utilisé afin de discriminer les effets significatifs positifs et négatifs des facteurs sur les réponses étudiées (modèles).

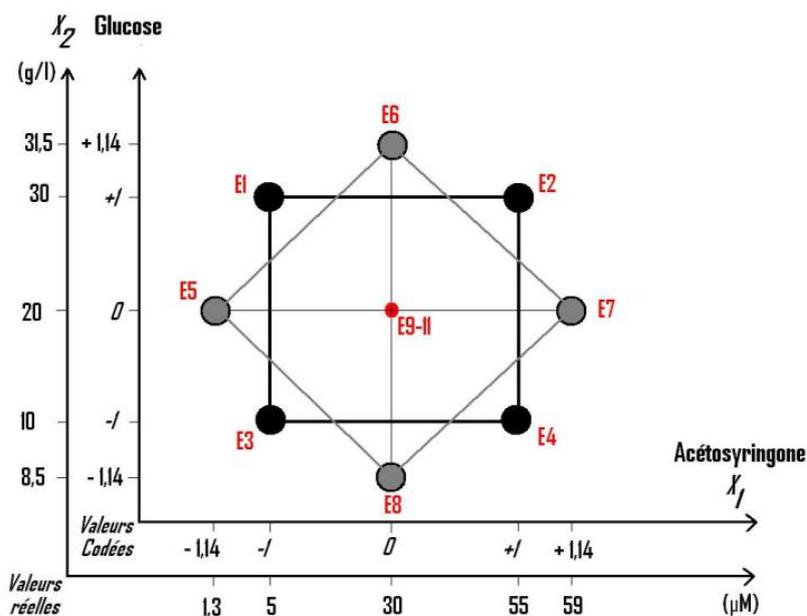


Figure 1. Plan d'expérience CCD et niveaux de chacun des deux facteurs (X_1 : Acétosyringone ; X_2 : glucose ; **E1** à **E4** : plan factoriel 2^k ($k=2$) ; **E5** à **E8** : plan en étoile ; **E9** à **E11** : expériences au centre).

Les données recueillies de ce plan permettront d'ajuster des modèles polynomiaux (équation 3) traduisant les effets de l'acétosyringone et du glucose et de leur interaction sur les réponses mesurées.

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

Où Y est la réponse ($Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} ; Y_{NMRE}); a_0 est l'intercepte de l'axe y ; a_j , a_{jj} ... a_{jl} sont les différents coefficients du modèle calculés par la méthode des moindres carrés (Goupy et Creighton, 2006); X_j et X_l sont les variables indépendantes (acétosyringone et glucose) et ε est l'erreur du modèle.

Pour pouvoir écrire les modèles de régression, les niveaux bas et hauts des facteurs sont codés respectivement -1 et 1 (figure 1). Les niveaux de la variable X_i sont codés et obtenus selon l'équation (2).

$$X_i = (W_i - W_0) / \Delta W_i \quad (2)$$

où X_i est la variable indépendante en valeur codée, W_i est la variable indépendante en valeur réelle, W_0 ($W_0 = 30$ et 20 pour respectivement l'acétosyringone et le glucose) est la variable indépendante en valeur réelle au centre et ΔW_i est le pas ($\Delta W_i = 25$ pour l'acétosyringone et 10 pour le glucose).

2.6. Optimisation multi-critères

La fonction de désirabilité est l'une des approches les plus utilisées dans l'optimisation multicritères (Bourguignon et Massart, 1991 ; Guillaume et Guinchard., 1996 ; Dewé *et al.*, 2004 ; Jeong et Kim, 2009, Amdoun, 2018). Elle est basée sur la transformation de toutes les réponses obtenues à partir de différentes échelles de mesure en une échelle unique. Les valeurs des fonctions de désirabilité $di(Y_i)$ sont

comprises entre 0 et 1 pour chaque réponse Y_i . La désirabilité globale D (*over all desirability*) est la moyenne géométrique des valeurs de désirabilité individuelle de chaque réponse $di(Y_i)$ calculée par l'équation (4). Les solutions optimales sont celles qui maximisent D (Jeong et Kim, 2009). Les concentrations optimales pour maximiser la réponse sont calculées à partir des premières dérivées du modèle ($Y_{Réac}$).

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

Où n est le nombre de réponses ($n = 4$; $Y_{Réac}$; Y_{Ind} ; Y_{Temps} et Y_{NMRE})

3. Résultats et Discussion

3.1. Résultats

Les résultats obtenus après l'application du CCD sont résumés dans le tableau 1. Ces résultats ont été utilisés pour l'ajustement des modèles traduisant les réponses de *Z. album* à l'infection par la souche A4 d'*A. rhizogenes* en fonction de deux facteurs : l'acétosyringone et le glucose, apportés à différentes concentrations.

3.1.1. Influence de l'acétosyringone et du glucose

Le R^2 est de 0,83%, ceci suggère que 83% de la réactivité est attribuée à l'effet de l'acétosyringone et du glucose, et que 17% de la variation totale n'est pas expliquée par le modèle. L'acétosyringone a un effet négatif sur le pourcentage de réactivité contrairement à l'effet quadratique du glucose. C'est-à-dire que plus la concentration du glucose augmente dans la suspension bactérienne, plus le pourcentage de réactivité est significativement important (figure 2).

Tableau 1 : Résultats obtenus après l’application du CCD.

Expériences	Facteurs en valeurs codées		$Y_{Réac}$ (%)	Y_{Ind} (%)	Y_{Temps} (jours)	Y_{NMRE}
	Acétosyringone	Glucose				
<i>E1</i>	-1	-1	90,0	6,0	12,5	4,0
<i>E2</i>	0	-1,147	75,9	10,0	12,6	2,2
<i>E3</i>	1	-1	58,0	9,7	13,6	2,3
<i>E4</i>	0	1,147	68,0	20,0	13,0	2,0
<i>E5</i>	1	1	76,0	10,0	13,0	4,8
<i>E6</i>	-1	1	88,0	12,0	13,2	3,3
<i>E7</i>	1,147	0	64,0	6,0	13,3	3,4
<i>E8</i>	-1,147	0	76,0	12,0	13,1	3,8
<i>E9</i>	0	0	64,0	12,8	13,2	3,4
<i>E10</i>	0	0	46,0	12,0	13,3	3,5
<i>E11</i>	0	0	58,0	12,8	13,3	3,6

Légende: $Y_{Réac}$: Pourcentage de réactivité - Y_{Ind} : Pourcentage d’induction- Y_{Temps} : Temps moyen d’apparition de la première racine - Y_{NMRE} : Nombre moyen de racine par explant.

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

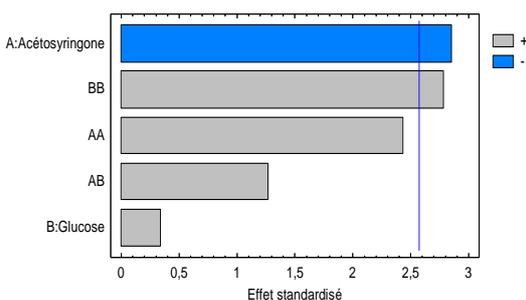


Figure 2 : Graphique de Pareto standardisé pour le taux de réactivité ($Y_{Réac}$).

L’effet quadratique de l’acétosyringone est négatif sur le pourcentage d’induction. A de fortes concentrations, elle inhibe donc l’induction des racines. Le glucose par contre à une influence positive (Figure 3).

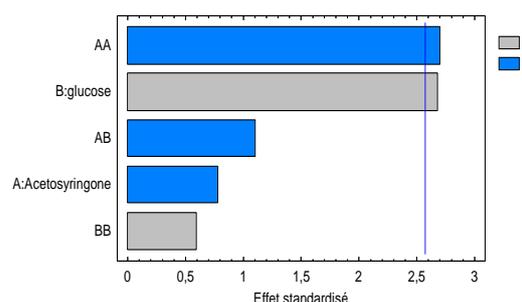


Figure 3 : Graphique de Pareto standardisé pour le Taux d’induction des racines (Y_{Ind}).

Une légère variation est observée entre les temps d’induction les plus précoces et les plus tardifs. En effet, le temps d’apparition des racines varie de 12, 5 à 13, 6 jours. Bien que l’erreur type d’estimation est légèrement élevée (0, 2), le modèle Y_{Temps} explique 88% de la variabilité globale.

L’effet de l’interaction acétosyringone-glucose est positif sur la précocité d’apparition des racines. Il en est de même pour l’effet quadratique du glucose. L’effet de l’acétosyringone retarde le temps d’apparition des racines (Figure 4).

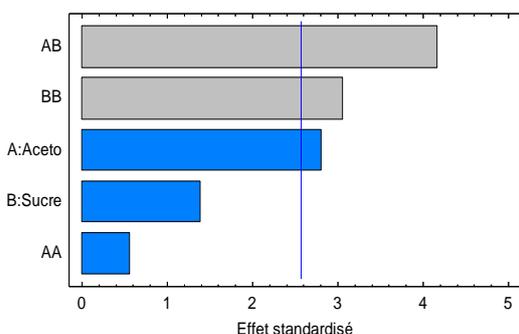


Figure 4 : Graphique de Pareto standardisé pour le temps moyen d'apparition de la première racine (Y_{temp}).

Le nombre moyen de racines par explant varie de 2 à 4,8 racines/explant. La valeur du coefficient de détermination R^2 est de 0,75, donc le modèle Y_{NMRE} (équation 8) explique 75% de la variabilité globale.

L'effet d'interaction de l'acétosyringone-glucose est positif sur le nombre moyen de racines par explant (Figure 5).

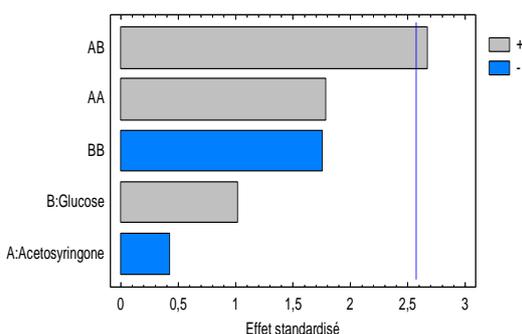


Figure 5 : Graphique de Pareto standardisé pour Y_{NMRE} .

3.1.2. Optimisation multi réponses

Pour trouver un compromis, la fonction de désirabilité D a été appliquée pour déterminer la combinaison [acétosyringone – glucose] qui optimise de façon simultanée plusieurs réponses.

Les solutions qui maximisent D (0,49, Figure 6) sont : - 0,750 pour l'acétosyringone et -1,147 pour le glucose équivalent à 11,25 μM et 8,5 g/l respectivement. Ces concentrations permettent d'obtenir sur 100 explants infectés : 87% de réactivité, 8% du pourcentage d'induction, 12 jours pour le temps d'apparition des racines et 3 racines environ par explant.

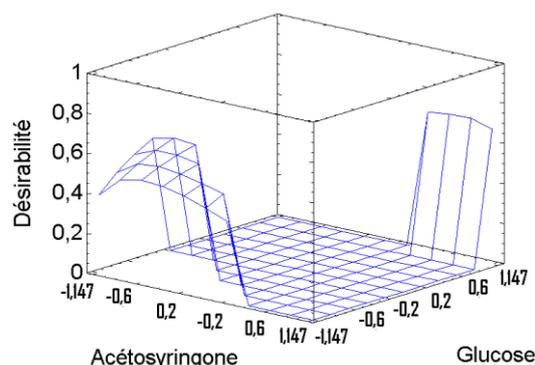


Figure 6 : Surface de réponse des valeurs de désirabilité globale (D) en fonction de la concentration de l'acétosyringone et du glucose.

3.2. Discussion

Nos résultats montrent que l'acétosyringone inhibe la formation de cal. Ce résultat pourrait être attribué à l'espèce végétale en question. En effet, certaines plantes ne nécessitent pas la suractivation des gènes *vir* de l'*A. rhizogenes* pour qu'elles réagissent à l'infection. Kovalenko et Maliuta (2003) ont observé la formation de CRs chez les explants de *Glycyrrhiza sp* infectés par la souche 8196 d'*A. rhizogenes* sans l'apport d'acétosyringone. Certaines plantes dites récalcitrantes peuvent être transformées en suractivant les gènes *vir* de la bactérie par des signaux chimiques tel que l'acétosyringone ou bien par la culture de l'*Agrobacterium* dans un milieu ayant contenu des tissus blessés de la plante à infecter (Tao et Li, 2006). Le *Zygophyllum album* est une espèce qui répond à l'infection par *A. rhizogenes*, elle n'est donc pas récalcitrante. L'apport du glucose par contre améliore le taux de réactivité (formation de cal) chez le *Z. album*.

Plusieurs espèces infectées par la souche A_4 présentent des taux d'induction différents. Pour notre essai, le meilleur taux d'induction des CRs est de 20%. Il est de 70 % pour *Valeriana wallichii* (Banerjee *et al.*, 1998), 98% pour *Nicotiana*, 80% pour *Datura Duboisia*, 34% pour *D. metel* (Moyano *et al.*, 1999) et 55 % pour *Torenia forniieri* (Tao et Li, 2006). Amdoun *et al.* (2006) ont trouvé un taux d'induction de 20% pour les tiges de *Datura innoxia* et 22% pour le *Datura stramonium*. Tao et Li (2006), rapportent que la concentration de l'acétosyringone affecte plutôt le taux

d'induction de CRs avec un optimum à 30 μM qui permet d'avoir un taux d'induction de 80% contre 25% pour les explants infectés avec la bactérie sans acétosyringone. Cependant dans notre cas, l'acétosyringone bloque l'induction des CRs chez *Z. album* alors que le glucose l'améliore. Ce résultat confirme que cette espèce n'est pas récalcitrante à la transformation génétique par la souche *A4*.

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

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

Orlikowska *et al.* (1995) rapportent que des composés phénoliques comme l'acétosyringone et des sucres tels que le glucose et l'acide glucuronique sont impliqués dans l'expression des gènes *virA*, *virG* et *ChvE* et augmentent l'excision de l'ADN-T. Les résultats décrits par ces auteurs pourraient expliquer nos observations concernant l'effet synergique de l'acétosyringone et du glucose qui améliore la précocité d'apparition des CRs et le nombre de racine par explant. Pour notre étude, le meilleur nombre de racines obtenu est de 4,8 racines/explant chez *Z. album*. Ce nombre est acceptable en comparaison avec d'autres espèces. En effet, Chez *Opium popy* le nombre de racines induites par explant est de 4,1 racines (Park et Fachini, 2000) alors qu'il ne dépasse pas 3 racines par explant chez *Datura innoxia* et *D. stramonium* (Amdoun *et al.*, 2006).

Sur 100 explants infectés, le rendement estimé est de 40 lignées de CRs chez *Z. album*. Ces lignées (Figure 7) seront par la suite caractérisées et sélectionner afin de retenir les meilleures pour la production des métabolites secondaires.

Nos résultats montrent que le glucose ajouté à la suspension bactérienne d'*A4*, améliore la formation de cals, de racines et la précocité d'apparition des CRs, alors que l'acétosyringone inhibe ces paramètres. L'interaction synergique de ces deux facteurs permet d'améliorer la précocité d'apparition des CRs et leur nombre ce qui constituent les résultats les plus intéressants pour la production de CRs chez *Z. album*. En effet, l'obtention d'un grand nombre de lignées racinaires de départ est un fait recherché dans un programme de sélection. Il permet l'augmentation de la probabilité d'avoir des lignées performantes en termes de biomasse et de biosynthèse de métabolites secondaires.

Grâce à la fonction de désirabilité *D*, Les solutions calculées (11,25 μM et 8,5 g/l) respectivement pour l'acétosyringone et le glucose permettraient d'obtenir sur 100 explants infectés : 87% de réactivité, 8% du pourcentage d'induction, 12 jours pour le temps d'apparition des racines et 3 racines environ par explant.

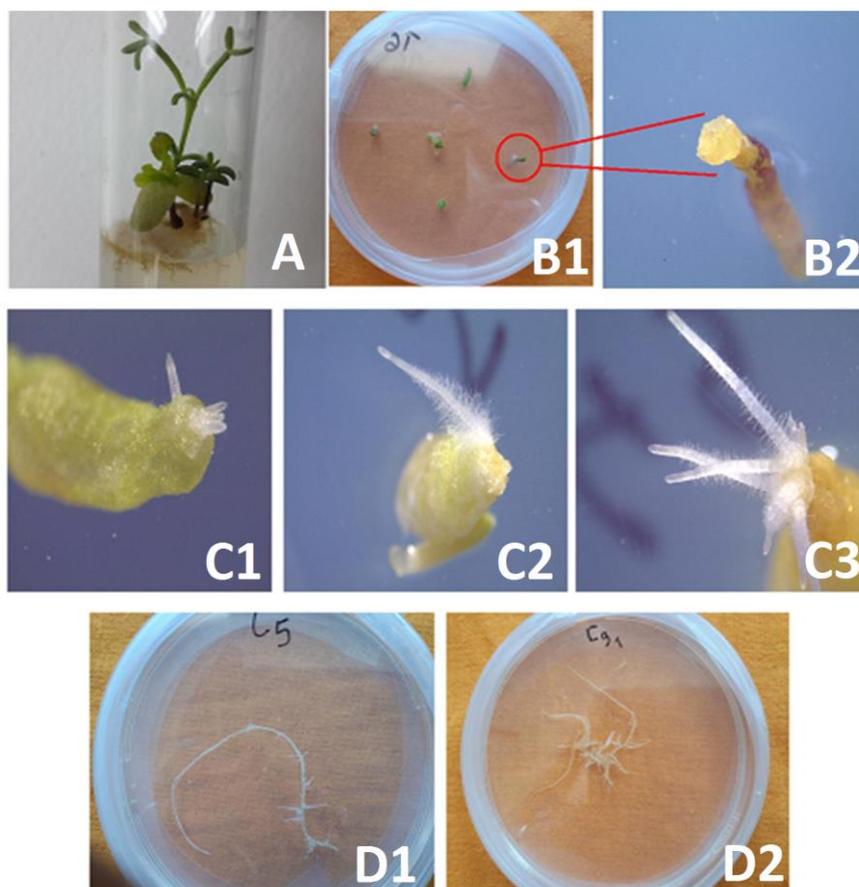


Figure 7 : Obtention de CRs. A: vitrosemis ; B1-B2: formation de cals ; C1-C2-C3: apparition et évolution des CRs au site d'infection ; D1-D2: lignées obtenues.

4. Références

- Amdoun, R., Khelifi, L., Khelifi-Slaoui, M., Amroune, S., Asch, M., Assaf-Ducroq, C., Gontier, E. The desirability optimisation methodology; a tool to predict two antagonist responses in biotechnological systems: case of biomass growth and hyoscyamine content in elicited *Datura stramonium* Hairy roots. *Iranian Journal of Biotechnology*. 2018, vol. 16, n° 1, p. 11-19.
- Amdoun, R. Optimisation de la production par voie biotechnologique des alcaloïdes tropaniques à partir de chevelus racinaires de *Datura stramonium* L. : Approche par modélisation mathématique. Thèse de Doctorat. ENSA., El-Harrach, 2010.
- Amdoun, R., Khelifi, L., Zarouri, B., Slaoui, M., Amroune, S. Production de chevelus racinaires chez deux espèces de *Datura* par transformation génétique *in vitro*. *Revue Biotechnologies végétales*. 2006, n°00, p. 7-9.
- Ankenbauer, R.G., Nester, E.W. Sugar-mediated induction of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes: structural specificity and activities of monosaccharides. *Journal of Bacteriology*. 1990, vol. 172, n° 11, p. 6442 - 6446.
- Ayad, R. Recherche et Détermination structurale des métabolites secondaires

- de l'espèce : *Zygophyllum cornutum* (Zygophyllaceae)., Thèse de Magister. Univ. Mantouri Constantine, 124p. 2010.
- Banerjee, S., Rahman L., Uniyal G.C., Ahuja P.S. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Science. 1998, vol. 131, p. 203-208.
- Barakat Makhzoum, A. Mise en place d'un système de transfert de gènes et de régénération de plantes *in vitro* pour l'étude de la régulation du métabolisme des alcaloïdes chez *Catharanthus roseus* L. Application au promoteur de la déacétylvindoline 4-O-acétyltransférase. Thèse de Doctorat. Univ. Tours, vol. 137 p. 2007.
- Bhagat, P., Verma, S. K., Singh, A. K., Aseri, G. K., Khare, N. Evaluation of influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on efficiency of hairy root induction in *Rauwolfia serpentina*. *Indian J. Genet*, 79(4), 760-764. 2019.
- Bourguignon, B., Massart D.L. Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function. *J. Chromatogr.* 1991, vol. 586, p. 11 – 20.
- Box, G., Hunter, E.P., William, G., Hunter, J. *Stuart «Statistics for Experimenters»*. Deuxième édition. John Wiley and Sons. New-York. 2005. 633p.
- Cangelosi, G.A., Ankebauer, R.G., Nester, E.W. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Genetics*. 1990, Vol. 87, p. 6708-6712.
- Chandra, S., Chandra, R. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochem Revue*. 2011, vol. 10, p. 371–395.
- Dewé, W., Marini, R.D., Chiap, P., Hubert, J. Development of response models for optimising HPLC methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2004, vol. 74: p. 263 – 268.
- Flores, H.E., Vivanco, J.M., Loyola-Vagas, V.M. Radicle biochemistry : the biology of root-specific metabolism. *Trends plant Sci*. 1999, vol.4, p. 220-226.
- Gelvin, S.B. "Improving plant genetic engineering by manipulating the host." *Trends in Biotechnology*. 2003, Vol. 21, n°3, p. 95-98.
- Gholami, Z., Babaeian Jelodar, N., Pakdin Parizi, A., Dadmehr, M. Optimization of hairy root induction conditions in radish (*Raphanus sativus* L.) and evaluation of biosynthesis ability of secondary metabolites in hairy root cultures. *Agricultural Biotechnology Journal*, 11(1), 99-118. 2019.
- Goupy, J., Creighton, L. *Introduction aux plans d'expériences*, Edition : Dunod, 2006.
- Guillaume, Y., Guinchard, C. Method to study the separation of eight phydroxybenzoic esters by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1996, vol. A. 727, p. 93 – 99.
- Jeong, I.J., Kim, K.J. An interactive desirability function method to multiresponse. *Journal of Quality Technology*. 2009, Vol. 12, n°4, p. 214 - 219.
- Kim, Y., Wyslouzil, B.E., Weathers, P.J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In vitro cell. Dev. Plant*. 2002, vol. 38, p.1-10.
- Kovalenko, P.G., Maliuta, S.S. An effect of transformation by Ri-plasmids and elicitors on licorice cells and secondary metabolites production. *Ukrainica bio organica acta*. 2003, Vol.1, n°1, p. 50-60.
- Lee, Y.W., Jin, S., Sim, W.S., Nester, E.W. The sensing of plant signal molecules by *Agrobacterium* genetic evidence for direct recognition of phenolic inducers by the Vir A protein. *Gene*. 1996, vol. 179, p. 83-88.

- Martins, T.M., Domingos, A., Novo.C., Lourenco, L. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* infection on *in vitro* rooting of *vitis vinifera*. *Vitis*. 2003, vol.42, n°3, p. 159-161.
- Megdiche-Ksouri, W., Medini, F., Mkadmini, K., Legault, J., Magné, C., Abdelly, C., Ksouri, R. LC–ESI–TOF–MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf. *Food Chemistry, SciVerse Science Direct*. 2013, vol. 139, p.1073–1080
- Meng, X.L., Riordan, N.H., Casciari, J.J., Zhu, Y., Zhong, J., Gonzalez, M. J., Miranda-Massari, J. R., Riordan, H.D. Effects of a high molecular mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. *PR Health Science Journal*. 2002, vol. 21, p. 323–328.
- Moustafa, A. M.Y., Khodair, A.I., Hammouda, F.M., Husseiry, A., Phytochemical and toxicological studies of *Zygophyllum album* L. *Journal Pharmacol. Toxicol Egypt*. 2007, Vol.2, n°3, p. 220 -237.
- Moyano, E., Jouhikainen, K., Tammela, P., Palazon, J., Cusido, R.M., Pinöl, M.T., Teeri, T.H., Oksman-Caldenty, K.M. Effect of pmt gene overexpression on tropane alkaloid production in transformed root cultures of *Datura metel* and *Hyoscyamus muticus*. *Journal of Experimental Botany*. 2003, vol. 54, n° 381, p. 203-211.
- Murashige, M., Skoog, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 1962, vol. 15, p. 473–497.
- Orlikowska, TK., Cranston, HJ., Dyer, WE. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of the Safflower cultivar 'Centennial'. *Plant Cell Tissue Organe Cult*. 1995, vol. 40, p. 85–91.
- Park, S.U., Facchini, P.J. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Opium poppy*, *Papaver somniferum* L., and *California Poppy*, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *Journal of experimental Botany*. 2000, vol. 51, n°347, p.1005-1016.
- Schimoda, N., Toyoda-Yamamoto, A., Aoki, S., Machida, Y. Genetic evidence for an interaction between the VirA sensorprotein and the ChevE sugar binding protein of *Agrobacterium*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, Vol.268, n°35 p. 26552-26558.
- Scriban, R. *Biotechnologie*. Edition : Techniques et documentation. 1999. 1042p. Paris.
- Shao, F., Qiu, D. Tissue Culture and Hairy Root Induction of *Salvia miltiorrhiza*. In *The Salvia miltiorrhiza Genome* (pp. 163-171). Springer, Cham. 2019.
- Souret, F.F., Kim Y., Wyslouzil, B.E., Wobbe, K.K., Weathers, P.J. Scal-up of *Artemisia annua* L. hairy root cultures produces complex patterns of terpenoid gene expression. *Biotechnology and bioengineering*. 2003, vol. 83, n°6, p. 653-669.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K. Hairy root culture for mass production of high value secondary metabolites., *Critical Reviews in biotechnology*. 2007, vol. 7, p. 29-43.
- Tao, J., LI, L. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South Africa Journal of Botany*. 2006, vol. 72, p. 211-216.
- Tepfer, D. La transformation génétique de plantes supérieure par *Agrobacterium rhizogenes*. 1982, *Deuxième colloque sur les recherches fruitières*. Bordeaux, Ed. INR-CTIFL, p. 46-53.
- Thikhomiroff, C. Mécanismes de transformation de plantes dicotylédones par *Agrobacterium tumefaciens*.2002, :<[http://www. Tikho. com](http://www.Tikho.com)>.
- Tian, L. Using Hairy Roots for Production of Valuable Plant Secondary Metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2015, vol. 149, p. 275–324.

- Tzfira, T., LI J., Lacroix, B., Citovsky, V. *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetic*. 2004, Vol.20, n° 8 p. 375-383.
- Vallet, A. Contribution a l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill ; transformation par l'*Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus racinaires. DEA. Génie enzymatique, bioconversion et microbiologie. Université de Picardie Jules verne. In. 1996.
- Verpoorte, R., Memelink, J. "Engineering secondary metabolite production in plants." *Current Opinion In Biotechnology*. 2002, Vol.13, n°2, p. 181-187.
- Wise, A.A., Voinov, L., Binns, A.N. Inter subunit complementation of sugar signal transduction in VirA hereridimers and posttranslational regulation of VirA activity in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 2005, Vol. 187, n°1.p 213-223.