

R É S U M É

de la thèse de doctorat

RECHERCHE POUR L'OBTENTION D'UN PRODUIT À BASE D'EXTRAITS BIOLOGIQUEMENT ACTIFS EFFICACES DANS LA PROTECTION ANTIFONGIQUE DES PLANTES

Doctorant: Alina G. PAVEL (PERIȘOARĂ)

Coordinateur scientifique: *Prof. univ.Dr. Stelica CRISTEA*

MOTS-CLÉS: *bio-fongicide, Tagetes erecta, substances biologiquement actives, protection des plantes, phytostimulateur, agriculture écologique*

INTRODUCTION

Les plantes ont la propriété de produire des métabolites secondaires ayant pour rôle d'inactiver les ravageurs. Selon la méthode de production, les pesticides végétaux peuvent être à base d'extraits de plantes ou d'huiles volatiles. (Vidyasagar et Tabassum, 2013). Et ils peuvent être obtenus à partir de différentes parties des plantes, fraîches ou séchées, à savoir les feuilles, les fleurs, les racines, les graines ou les fruits. En général, les parties sèches des plantes sont préférées, car grâce à ce processus, la quantité d'eau est réduite, obtenant ainsi un rendement plus élevé en substances actives (Abdulzahra et al., 2020 ; Chougule et Andoji, 2016). Selon les données de la littérature (Gakuubi et al., 2016), les plantes riches en composés bioactifs ayant une activité contre les ravageurs font partie des familles d'espèces *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Myrtaceae* et *Solanaceae*. Les composés phytochimiques d'extraits de plantes, tels que les acides, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines et les terpénoïdes, ne représentent qu'une partie des substances biologiquement actives utilisées dans la formulation des produits phytopharmaceutiques (Sanchez Pino et al., 2013).

ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES

Les espèces végétales *Tagetes erecta* L. (Souce) et *Trigonella foenum-graecum* L. (Fenugrec), qui font partie des familles des *Asteraceae* et *Fabaceae*, se trouvent spontanément répandues et cultivées à l'échelle mondiale dans divers habitats géographiques, mais aussi dans la microsphère du territoire roumain, ayant une grande importance pour les industries agricole, horticole, pharmaceutique, alimentaire et nutraceutique. Leur large diffusion à l'échelle mondiale facilite leur exploitation. Au fil du temps, une série d'études phytochimiques ont été réalisées sur des extraits obtenus à partir de ces deux types d'espèces végétales, mettant en évidence la présence en concentrations élevées de composés phénoliques (flavonoïdes et polyphénols), de

saponines, d'alcaloïdes, d'huiles volatiles, de protéines et de glucides. Ces composés ont été scientifiquement prouvés pour leurs propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Cependant, les analyses sur ces deux espèces de plantes sont limitées à nos pays, et les présentes thèses de recherche viennent compléter le tableau de leur utilisation dans l'industrie des biopesticides à base de substances biologiquement actives végétales, dans le but de soutenir et de développer une agriculture et une agriculture écologiques. limiter l'utilisation de pesticides chimiques conventionnels.

CONTRIBUTION PERSONNELLE

OBJECTIFS

Le premier objectif du présent travail consistait à obtenir des extraits de plantes riches en composés phytochimiques aux propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, de manière économiquement efficace et respectueuse de l'environnement, ainsi qu'à analyser le profil phénolique et antioxydant, et à étudier le profil germinatif.

Un deuxième objectif consistait à associer un extrait végétal riche en composés actifs phytoprotecteurs avec des rhizobactéries de l'espèce *Bacillus* spp., ayant un effet antipathogène et phytostimulant, pour une utilisation dans l'industrie phytopharmaceutique. La thèse de doctorat intitulée "**RECHERCHE POUR L'OBTENTION D'UN PRODUIT À BASE D'EXTRAITS BIOLOGIQUEMENT ACTIFS EFFICACES DANS LA PROTECTION ANTIFONGIQUE DES PLANTES**" est composée de deux parties et structurée en six chapitres.

LA PARTIE I (Étude Bibliographique) comprend trois chapitres dédiés à l'étude de la littérature (Chapitres I, II et III), dans lesquels sont présentés l'état actuel des connaissances en matière de biopesticides, la législation réglementant ces types de produits au niveau européen, et les plantes riches (*Tagetes erecta* et *Trigonella foenum-graecum*) en composés phytochimiques ayant un effet antioxydant et antimicrobien sur les ravageurs des plantes.

LA PARTIE II (Recherche Propre) constitue ses contributions concernant les méthodes d'extraction, la caractérisation des composés phytobiologiques présents dans les six variantes d'extraction obtenues à partir des deux types d'espèces végétales en vue de leur utilisation dans l'industrie phytopharmaceutique, et est structurée en trois chapitres.

Le chapitre VI comprend les méthodes d'extraction, la caractérisation des composés phénoliques, l'évaluation de l'activité antioxydante et l'étude bio-germinative des six types d'extraits sur graines de concombre et de radis. Le matériel végétal étudié était des fleurs séchées de *Tagetes erecta* obtenues à partir de culture écologique et des graines séchées de *Trigonella foenum-graecum*. Les méthodes d'extraction utilisées étaient la macération à température ambiante et l'assistance thermique en phase de concentration, à des températures de 35-40°C. Les solvants sélectionnés appartiennent aux alcools concentrés, au propylène glycol (50%) et à l'éthanol (70%). Ainsi, des extraits éthanoliques (40% et 70% d'éthanol) ont été obtenus de chaque espèce végétale dans un rapport de 1:10, 1:20, et des extraits en propylène glycol (50%) dans un rapport de 1:10. Les concentrations en composés phénoliques ont été déterminées, l'activité

antiradicalaire a été déterminée par la méthode DPPH, la teneur en matière sèche a été déterminée et le comportement des six variantes d'extraits a été évalué par rapport au témoin (eau distillée) et aux solvants dans lesquels le l'extraction a été réalisée (éthanol 40%, éthanol 70%, propylène glycol 50%) sur des graines de concombre et de radis, en appliquant le test biologique de germination (à des concentrations de 0,10%, 0,50%, 1,00% et 1,50%).

Les extraits obtenus ont montré une concentration élevée en polyphénols totaux exprimés en équivalents d'acide caféique (CAE) mg/ml et en composés flavonoïdes exprimés en équivalents rutine (RE) mg/ml. La variante de l'extrait de fleur de *Tagetes erecta* dans 40% d'éthanol présentait la plus forte concentration de composés phytochimiques (CAE mg/ml $6,723 \pm 0,511$ et RE mg/ml $9,102 \pm 0,430$), une réponse redox plus prononcée (EC_{50} μ l/ml extrait: $0,47 \pm 0,007$ RSD=1,130) et un effet positif sur les graines stimulant la germination et la croissance des racines du solvant à toutes les doses d'échantillon étudiées (0,10% - Gi% - 288,24% ; 0,50 % - Gi% - 122,88% ; 1,00% - Gi% - 196,41% et 1,50% - Gi% - 17,41%), a été sélectionné pour une étude antimicrobienne (antifongique) plus approfondie des souches de *Monilinia laxa*, *Fusarium graminearum* et *Aspergillus niger* et pour déterminer l'activité antifongique synergique associée aux rhizobactéries appartenant à l'espèce *Bacillus*.

Le chapitre V comprend l'étude quantitative et qualitative des composés phénoliques de l'extrait de *Tagetes erecta* (éthanol 40 %) (sélectionné suite aux résultats obtenus dans les études du chapitre VI), la teneur en sucres réducteurs, la teneur en protéines solubles, l'activité antioxydante à travers les méthodes CUPRAC, TEAC, DPPH et ABTS, la poursuite de l'étude biogerminative sur les graines de blé et la détermination de l'activité synergique antifongique, prébiotique, antibiofilm et antipathogène avec les espèces bactériennes *Bacillus*.

Les résultats du Chapitre V ont consisté en l'évaluation qualitative des composés polyphénoliques totaux exprimés en équivalents acide gallique mg/ml- GAE et des flavonoïdes, exprimés en équivalents quercétine mg/ml - QE), mais également quantitativement par la méthode HPLC-HESI, les solubles la teneur en protéines, la teneur en sucres réducteurs, la mise en évidence des bandes spécifiques de composés phénoliques dans les résidus végétaux par ATR-FTIR, l'étude de l'activité phytotoxique/biostimulatrice sur les graines de blé par rapport au solvant (éthanol 40%), l'activité antimicrobienne, ainsi que ainsi que l'activité antioxydante par les méthodes DPPH, CUPRAC, FRAP et TEAC. Pour intensifier l'effet antifongique, des études de synergie ont été réalisées pour les rhizobactéries stimulées par l'extrait de fleur de *Tagetes erecta*. Les résultats obtenus ont indiqué une composition plus élevée de TPC - $15,12 \pm 0,27$ GAE - mg/ml, par rapport à la concentration de flavonoïdes totaux, TFC - $2,01 \pm 0,03$ QE mg/ml. Quant aux méthodes d'identification qualitative des composés phénoliques de l'extrait de *Tagetes erecta* dans l'éthanol à 40%, elles ont été réalisées par HPLC-HESI et les résultats obtenus ont indiqué 3,36% (27 composés) du total des composés polyphénoliques quantifiés et 20,15% du total des flavonoïdes. , dont les composés majoritaires étaient représentés par la quercétine - 383,74 mg/l, l'acide syringique - 30,71 mg/l, l'acide ellagique - 26,80 mg/l, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque -

20,50 mg/l, myricétine – 13,64 mg/ml et l'acide chlorogénique - 11,85 mg/L. L'extrait avait une densité de $1,0526 \pm 0,0016$ g/ml et une teneur en matière sèche de 3,6 %. Concernant les fleurs séchées de *Tagetes erecta* (matériel végétal), les bandes dans l'intervalle de 650-4000 cm^{-1} mettent en évidence la présence de certains composants biochimiques primaires et macronutriments, notamment des protéines, des lipides et également des glucides. Selon la littérature, les glucides jouent un rôle important dans les plantes en tant que nutriment.

La recherche sur l'activité antioxydante par les méthodes spectrophotométriques DPPH, CUPRAC, FRAP et TEAC montre que l'extrait a enregistré une activité antioxydante élevée tout au long des 4 méthodes d'analyse, mais cependant, l'activité antioxydante la plus élevée a été enregistrée par CUPRAC ($65,81 \pm 1,51$ Trolox mM/ml), comparé à toutes les autres méthodes étudiées. Cela a été possible car les antioxydants hydrophiles et lipophiles peuvent être analysés avec cette méthode. Cela est possible grâce au fait que les antioxydants hydrophiles et lipophiles peuvent être analysés par cette méthode.

Dans la recherche du test biologique de germination concernant l'évaluation du comportement de l'extrait de fleur de *Tagetes erecta* dans 40% d'éthanol, il a été prouvé qu'il améliorait la croissance des racines des graines de blé germées, par rapport au contrôle mais aussi au solvant à 0,50% de concentration (extrait Gi RRG - 112,81%; solvant RRG - 73,41%).

Pour déterminer l'activité antifongique de l'extrait, les espèces suivantes de souches phytopathogènes ont été utilisées: *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum* et *Monilinia laxa*. Un criblage antifongique qualitatif a été réalisé en incorporant l'extrait dans un milieu PDA liquéfié refroidi à 40-45°C. L'extrait de *Tagetes erecta* a été inoculé dans le milieu de culture à des concentrations de 0,5%, 1% et 5%. Les résultats de la recherche indiquent que l'extrait a réduit le diamètre du mycélium des souches de *Fusarium graminearum* et de *Monilinia laxa*. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été observé chez la souche fongique *Fusarium graminearum* à la concentration maximale testée (5%), avec un pourcentage de $54,17 \pm 5,89\%$ (par rapport au solvant, $p < 0,05$), et dans le cas de la souche fongique *Monilinia laxa*, une inhibition du diamètre des colonies a été observée de $52,29 \pm 2,60\%$ à la concentration de 0,10 % (par rapport au solvant, $p < 0,05$). Par rapport au solvant ($p < 0,05$), chez la souche fongique *Aspergillus niger*, on a observé une augmentation significative du mycélium.

La recherche quantitative de l'activité antifongique a été réalisée dans le milieu RPMI 1640 en utilisant la méthode de microdilution dans des plaques de 24 puits. Les concentrations testées de l'extrait (0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5% et 3,0%) ont été réalisées directement dans le milieu de culture dans un volume de 2 ml de RPMI 1640 ensemencé avec l'inoculum fongique ajusté à l'étalon néphélométrique 1 McFarland (10^6 UFC/ml). Ainsi, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été évaluée. Pour la souche *Monilinia laxa*, une réduction non significative de la viabilité cellulaire a été observée par rapport au solvant à toutes les concentrations étudiées, et aucune réduction significative de la viabilité n'a été observée par rapport au contrôle positif. Pour la souche *Fusarium graminearum*, la viabilité cellulaire a été diminuée pour l'extrait à la concentration de

3% (6,67±2,31%), la différence significative a été réalisée par rapport à l'activité du solvant. Pour *Aspergillus niger*, a montré une prolifération cellulaire accrue par rapport au contrôle (solvant), à des concentrations de 1,5 % (93,24±1,91 %) et 3 % (95,95±1,91 %).

Pour l'effet d'évaluation antifongique, 10 µl de l'échantillon ont été incorporés sur le milieu PDA, en utilisant des concentrations de 0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5% et 3,0%. Ainsi, on a constaté que la souche fongique *Monilinia laxa* était inhibée, et pour la souche *Fusarium graminearum*, l'inhibition était partiellement complète avec des différences significatives par rapport au solvant aux concentrations de 0,1% et d'extrait de 0,5%. Dans la souche *Aspergillus niger*, l'inhibition la plus élevée a été observée à la concentration la plus faible (0,10 %) dans l'extrait et dans le solvant.

Lors de l'évaluation des capacités d'adhésion microbienne au substrat inerte de l'extrait de *Tagetes erecta* et au solvant (éthanol à 40 %) sur les souches de champignons pathogènes étudiées, il a été constaté que l'adhésion microbienne était significativement inhibée pour la souche *Fusarium graminearum* (à concentrations de 1,5% et 3%) et pour la souche *Aspergillus niger* (1%, 3% et 1,5%). Pour *Monilinia laxa*, une inhibition de l'adhésion a été constatée pour le contrôle positif, mais avec une augmentation significative par association avec l'extrait. Ce phénomène est probablement dû à la présence de sucres à teneur réduite et de polyphénols aux propriétés antioxydantes dans les compositions.

En étudiant l'activité prébiotique et antibiofilm de l'extrait (concentrations 50-1,56%) sur des souches PGPR (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquegaciens* et *Bacillus subtilis*), il a été mis en évidence que l'extrait, mais aussi le solvant expriment une activité antibactérienne. La valeur de la CMI était de 12,5 % pour les trois souches bactériennes étudiées. Dans la souche bactérienne *Bacillus licheniformis*, une augmentation significative de la viabilité cellulaire a été constatée concernant le solvant à la concentration de 1,56% (114,59±1,26%), mais également pour le contrôle positif. Au contraire, pour la souche *Bacillus amyloliquefaciens*, il a été observé que l'échantillon d'extrait inhibait significativement la viabilité microbienne par rapport au solvant et au contrôle positif.

Parallèlement, un effet synergique concernant la stimulation de l'adhésion des cellules microbiennes au substrat abiotique a été mis en évidence entre l'extrait de fleur de *Tagetes erecta* et la souche *Bacillus licheniformis*. Pour la souche *Bacillus amyloliquefaciens*, aucune différence significative n'a été constatée par rapport au contrôle positif, mais pour la souche bactérienne *Bacillus licheniformis*, toutes les variantes testées ont augmenté de manière significative l'adhésion microbienne. Selon des résultats scientifiques similaires, la souche bactérienne *Bacillus subtilis*, grâce à la présence du composant adénosine monophosphate cyclique (di-AMP cyclique), peut agir comme un signal extracellulaire influençant la formation du biofilm et l'attachement des cellules microbiennes à la surface biotique.

Dans l'étude visant à déterminer l'activité antifongique synergique de l'extrait de fleurs de *Tagetes erecta* et de rhizobactéries (espèce *Bacillus*), les variantes de souches de l'espèce *Bacillus spp* et les concentrations d'extrait ont été sélectionnées en fonction

des résultats obtenus pour la concentration minimale inhibitrice (MIC), de sorte que l'extrait entraîne une prolifération cellulaire accrue. Pour déterminer l'activité antifongique synergique sur les souches de *Fusarium graminearum*, *Monilinia laxa* et *Aspergillus niger*, des concentrations de 1,5% d'extrait et de solvant associés à la souche *Bacillus licheniformis* et de 1,5% et 3% d'extrait et de solvant associés à la souche *Bacillus subtilis* ont été utilisées. Ainsi, les résultats révèlent que les variants sélectionnés ont montré une bonne inhibition de la croissance mycélienne de $28,33 \pm 2,08$ mm et $26,67 \pm 1,53$ mm dans le cas de la souche *Bacillus subtilis* enrichie aux concentrations de 1,5% et 3% de *Tagetes erecta* sur la souche *Fusarium graminearum*, tandis que sur *Monilinia laxa*, on a enregistré un effet inhibiteur total, tant pour le mélange avec la suspension microbienne de *Bacillus spp.*, avec extrait que pour le mélange de souches de *Bacillus spp.*, avec solvant. Cependant, l'effet synergique entre l'extrait et la souche *Bacillus subtilis* était plus faible pour la souche fongique *Aspergillus niger*. Un effet inverse a été observé dans le cas de la souche *Bacillus licheniformis*.

Les deux souches de *Bacillus spp.* de notre étude ont montré une activité antagoniste variable sur les agents phytopathogènes, particulièrement sur la souche *Fusarium graminearum*.

Le chapitre VI contient les conclusions générales sur les résultats et l'article se termine par des références bibliographiques.

Notre recherche s'est concentrée sur l'obtention d'un produit d'origine naturelle qui pourrait être une solution viable en matière de protection des plantes, c'est pourquoi six variantes d'extrait de graines de *Trigonella foenum-graecum* et de fleurs de *Tagetes erecta* ont été obtenues. Ainsi, deux solvants d'extraction ont été utilisés, l'éthanol 70% et le propylène glycol 50%, et le processus d'extraction a été réalisé par macération à température ambiante et par légère assistance thermique pendant la phase de concentration. La principale raison de l'utilisation de ces types de solvants et de méthodes d'extraction était d'extraire les composés ayant des effets phytostimulants et antimicrobiens (fongicides) potentiels en quantité la plus élevée possible et, en même temps, de ne pas endommager les composés phytochimiques potentiellement extractibles. Selon les résultats obtenus, sur les deux espèces de plantes, l'application la plus efficace pour l'extraction de composés phytochimiques était celle assistée thermiquement. Ceci a été mis en évidence par les concentrations accrues en polyphénols et en flavonoïdes, mais aussi par une activité redox plus prononcée, par rapport aux variantes d'extrait obtenues en éthanol 70% et propylène glycol 50% (sans assistance thermique). Suite à l'étude bio-germinative, il a été mis en évidence que l'extrait de fleurs de *Tagetes erecta* dans 40% d'éthanol présentait un fort effet phyto-stimulant sur les graines de radis, un léger effet phyto-stimulant a été observé sur les graines de concombre après les avoir traitées avec *Trigonella foenum-graecum* extrait (40% d'éthanol) uniquement à la concentration la plus faible testée (0,10%).

De plus, les résultats de recherche obtenus et présentés dans cette thèse ont mis en évidence que l'extrait possède des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et cytoprotectrices élevées grâce aux composés présents dans la composition. L'extrait de fleur de *Tagetes erecta* a également montré un léger effet phyto-stimulateur sur les

graines de blé. L'évaluation de l'activité antifongique a été réalisée sur des milieux solides et liquides, en observant que l'extrait étudié atténue la croissance mycélienne, notamment pour les souches de *Monilinia laxa* et de *Fusarium graminearum*. La propriété de provoquer des maladies des souches fongiques est généralement due à leur caractère de formation de biofilms bactériens au-dessus des tissus végétaux, et l'application de l'extrait de fleur de *Tagetes erecta* pourrait empêcher l'adhésion d'agents phytopathogènes, mais aussi à la puissance des rhizobactéries concernant l'activité antifongique, la propriété qu'ils possèdent naturellement. Comme il ressort de notre étude, l'extrait de fleurs de *Tagetes erecta* conditionné dans 40% d'éthanol, en combinaison avec des souches de rhizobactéries (*Bacillus spp*), a présenté une mesure de biocontrôle viable, montrant leurs activités antagonistes contre l'agent phytopathogène, notamment contre la souche de *Fusarium graminearum*.

La recherche de cette thèse confère nouveauté et originalité en fournissant des informations qui pourraient être appliquées dans l'industrie biotechnologique agricole, notamment pour le développement d'un extrait antifongique enrichi en *Tagetes erecta* qui pourrait être la base d'un biopesticide puissant efficace contre les agents phytopathogènes des plantes et également, avec un effet stimulant sur la croissance et le développement des plants de légumes et des plantes céréalières. Ce travail fournit également des informations précieuses et originales concernant l'obtention de manière efficace, sûre, économique et respectueuse de l'environnement de certains extraits de plantes riches en composés phytochimiques ayant une utilisation potentielle dans l'industrie de la protection des plantes et de la phytostimulation.

Dans les 150 pages de cette thèse, il y a 33 tableaux, dont 30 originaux, 39 figures, dont 36 originales, et 233 références.

Les résultats obtenus au cours des études doctorales ont été diffusés dans 3 articles, dont 2 articles ont été publiés dans des revues notées par l'ISI (WOS) et 1 article a été accepté pour publication dans une revue notée par l'ISI (WOS).