

RÉSUMÉ

de la thèse de doctorat intitulée:

PLANT BIOSTIMULANTS BASED ON (BIO)MIMETICS OF STRIGOLACTONES

Doctorand: **BALA S. Ioana-Alexandra**

Coordonateur scientifique: **CS I Dr. OANCEA Florin**

MOTS-CLÉS: mimétiques de strigolactone, fungi phytopathogènes, *Trichoderma*

Les strigolactones (SLs) sont des composés naturels dérivés des caroténoïdes, libérés par les plantes dans le sol en tant que signaux de communication. Les SLs agissent comme des molécules de signalisation pour la germination des graines de plantes parasites et favorisent la ramification des hyphes des champignons mycorhiziens arbusculaires (AM). Ces molécules sont des phytohormones actives qui régulent l'architecture des divers organes des plantes et jouent un rôle essentiel dans les réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques.

Les strigolactones (SLs) ont le potentiel d'être utilisées en agriculture durable pour atténuer les divers stress auxquels les plantes sont confrontées. Les SL naturelles ainsi que les analogues synthétiques sont difficiles à obtenir en quantités suffisantes pour des applications pratiques. En même temps, les strigolactones fluorescentes seraient utiles pour comprendre le mécanisme de leurs effets, basées sur des techniques d'imagerie bio et de spectroscopie.

Le Chapitre I, intitulé "**Les Strigolactones - Signaux multifonctionnels**", comprend une analyse bibliographique sur les strigolactones qui sont des phytohormones essentielles dans la régulation du développement des plantes et des interactions avec leur environnement. Ces molécules fonctionnent comme des signaux chimiques qui contrôlent divers processus, y compris la ramification des tiges, la croissance des racines et les réponses au stress. Les strigolactones jouent un rôle crucial dans la symbiose mycorhizienne, facilitant la colonisation des racines par des champignons bénéfiques. De plus, ces composés sont impliqués dans la défense des plantes contre les agents pathogènes et dans l'adaptation aux conditions environnementales défavorables. Ainsi, les strigolactones sont des facteurs clés aux fonctions multiples, contribuant à l'optimisation de la croissance et de la santé des plantes.

Le Chapitre II, "**Utilisations des strigolactones synthétiques en agriculture**", vise à comprendre que les strigolactones synthétiques représentent une innovation significative en agriculture, offrant des solutions pour améliorer la croissance et la productivité des cultures. Ces molécules sont employées pour

encourager la ramification et le développement du système racinaire, ce qui permet une absorption plus efficace des nutriments et de l'eau. En outre, les strigolactones synthétiques peuvent renforcer la résistance des plantes face aux stress biotiques et abiotiques, tels que la sécheresse et les attaques de pathogènes. Elles facilitent également la symbiose mycorhizienne, en favorisant une relation bénéfique entre les racines des plantes et les champignons. Grâce à l'utilisation de strigolactones synthétiques, les agriculteurs peuvent obtenir des cultures plus robustes et résistantes, contribuant ainsi à une agriculture durable et performante.

Dans le **chapitre III** intitulé "**Synthèse de nouveaux mimiques de strigolactone et évaluation de leurs effets**", nous avons étudié l'effet d'un mimique de strigolactone (3-Méthyl-5-(benzo[de]isoquinolin-1,3-dion-2-yloxy)-5H-furan-2-one, avec un noyau de naftylamide lié par un groupe éther à l'anneau de furan-2-one) sur la ramification des hyphes et la croissance radiale de plusieurs champignons phytopathogènes. Il semble qu'il n'y ait pas de données disponibles sur l'effet des mimiques sur la croissance et la morphologie des colonies dans nos connaissances. Les premières souches testées étaient le *Colletotrichum acutatum* CBS 112980 et le *Sclerotinia minor* DSM 63016. Nos résultats ont démontré que le composé mimétique testé (SL6), plus facile à synthétiser que les analogues de strigolactone, a le même effet que le synthétique GR24, induisant une réponse de stress par la ramification des hyphes et inhibant la croissance des phytopathogènes. Les résultats sont discutés en tenant compte de leur importance tant pour les études fondamentales (rôle et récepteur de l'anneau D des SL chez les champignons phytopathogènes) que pour les applications pratiques - la modélisation du rhizomicrobiome des plantes. Dans une autre étude, de nouveaux mimiques de SL fluorescents ont été préparés contenant un système d'anneau de 1,8-naftalimid substitué, relié par un lien éther à un groupe bioactif de furan-2-one (SL20, SL21, SL26 et SL27). L'activité structurale, spectroscopique et biologique des nouveaux mimiques de SL sur les phytopathogènes a été étudiée et comparée à celle des mimiques de SL fluorescents synthétisés précédemment. Le groupement chimique en position C-6 de l'anneau de naftalimid influence les paramètres de fluorescence. Tous les mimiques de SL ont présenté des effets similaires à ceux du GR24 sur les phytopathogènes *C. acutatum*, *F. graminearum*, *R. solani* et *S. sclerotium*, indiquant leur aptitude pour des applications pratiques. Le modèle d'activité biologique dépendait de l'espèce fongique, du mimique de SL, de sa concentration et de l'ordre des hyphes. Cette dépendance est probablement liée à la spécificité de chaque interaction récepteur-fongique - mimique de SL, qui devra être analysée en profondeur. Sur la base des propriétés biologiques et des particularités spectroscopiques, un mimique de SL pourrait être un bon candidat pour des études microscopiques et spectroscopiques.

Dans une autre expérience, des strigolactones biomimétiques synthétiques ont été préparées en quantités de plusieurs grammes à partir de produits commerciaux disponibles, et tous les composés synthétisés ont été entièrement caractérisés. Les nouveaux mimiques de strigolactone synthétisés contiennent des fragments bioactifs de quinoline, de coumarine ou de N-phénylbenzamide, reliés à l'anneau bioactif de furan-2-one. Les nouveaux mimiques de strigolactone ont été testés sur les souches phytopathogènes représentées par *Fusarium graminearum* et *C. acutatum*. La plupart

des traitements avec les mimiques de strigolactone FG-30, FG-31, FG-33, FG-42 ont montré un effet inhibiteur significatif sur la croissance des deux champignons phytopathogènes testés, *F. graminearum* et *C. acutatum*. L'analyse qualitative a indiqué que tant le GR24 que les mimiques de SL avaient un effet sur la ramification des hyphes de *F. graminearum* et *C. acutatum*. Les résultats suggèrent que les mimiques de SL, en particulier FG-33 et FG-31, pourraient être utilisés comme agents de contrôle des phytopathogènes en raison de leurs effets inhibiteurs sur la croissance et la ramification des hyphes. Les futures études devraient se concentrer sur l'élucidation des mécanismes par lesquels ces composés influencent la croissance et le développement fongiques, ainsi que sur l'optimisation des concentrations pour une application pratique en agriculture durable.

Un autre étude s'est concentrée sur le test des propriétés biologiques du 2-(4-méthyl-5-oxo-2,5-dihydro-furan-2-yloxy)-benzo[de]isoquinoline-1,3-dione, un mimétique de strigolactone dérivé de l'anhydride 1,8-naphtalique (SL4). Ce composé présente des propriétés fluorescentes, mais n'a pas d'effets significatifs sur la croissance et la ramification fongique de *Aspergillus alliaceus*.

L'effet du SL6 sur la souche *Trametes versicolor* a également été testé, mais n'a pas eu un impact significatif sur la ramification des hyphes, les effets sur le diamètre des colonies étant minimes, avec une légère inhibition observée principalement à des concentrations plus faibles.

Dans le contexte de l'agriculture moderne, où les maladies causées par les fungi phytopathogènes constituent un problème majeur, le développement de nouveaux mimétiques de strigolactone et l'évaluation de leurs effets sur les champignons phytopathogènes revêtent une importance particulière, tout comme l'atténuation des divers stress auxquels sont confrontées les plantes.

Le **chapitre IV intitulé "Effet de la lumière laser et des mimétiques de strigolactone sur la croissance et le développement des souches de *Trichoderma*"** est subdivisé en plusieurs sections pour examiner les effets des traitements à la fois de manière individuelle et combinée. L'analyse de l'impact des mimétiques de strigolactone et de la lumière laser sur les souches de *Trichoderma* peut offrir de nouvelles perspectives sur la manière dont ces signaux moléculaires et facteurs environnementaux influencent le comportement et l'efficacité de ce groupe de champignons crucial.

L'objectif était d'étudier les effets des mimétiques de strigolactone et de la lumière laser sur la croissance et le développement des souches de *Trichoderma*. Cette recherche vise à mieux comprendre comment ces facteurs influencent la physiologie et le comportement du *Trichoderma*, avec des implications potentielles pour leur utilisation en agriculture et en biocontrôle. Ainsi, le premier **sous-chapitre 4.1** a mis en évidence **les effets de l'irradiation par la lumière laser bleue sur les activités enzymatiques et la sporulation de *Trichoderma atroviride* cultivé en présence de paille de riz en faibles quantités**. La lumière est connue pour son impact sur différents aspects du *Trichoderma*, avec des implications potentielles pour les applications industrielles et agricoles. Dans cette étude, nous avons examiné l'irradiation de *Trichoderma atroviride* avec de la lumière bleue en utilisant un système laser. Nous

avons évalué les activités des cellulases et des protéases ainsi que les effets de l'absorption UV-Vis du filtrat de culture sur la formation, la taille et le comportement des conidies et sur l'abondance apparente des chlamydo-spores, en fonction de la durée, de la dose d'irradiation et du moment de l'irradiation. Nous montrons que les effets sur les activités enzymatiques varient de positifs à neutres ou négatifs. Comparativement aux études antérieures, notre stimulation par la lumière ne présente pas d'effet négatif drastique sur l'activité cellulase (CMC-ase), mais semble retarder l'activité maximale au fil du temps. Les effets sur les protéases sont partiellement en accord avec la seule étude précédente rapportant les effets de la lumière sur l'activité protéase. Le nombre de conidies augmente après l'irradiation, ce qui est un comportement attendu, et nous montrons pour la première fois, à notre connaissance, que la taille des conidies et le nombre de chlamydo-spores augmentent également. Nos données suggèrent également que la dose la plus élevée a entraîné une agrégation des conidies autour de l'interface air-liquide, suggérant une caractéristique hydrophobe accrue.

Le deuxième **sous-chapitre 4.2**, intitulé "**Production d'enzymes par *T. atroviride* en présence de lumière laser bleue : une approche à grande échelle**", visait à étudier l'impact de l'irradiation sur le mycélium mature cultivé sur paille de riz et à extrapoler le processus à une échelle plus large. Pour ce faire, nous avons d'abord incubé *Trichoderma* avec de la paille de riz pendant 15 jours dans des récipients plus grands, suivis de trois irradiations à des intervalles de temps plus courts que dans notre étude précédente.

Dans cette étude, l'agent de biocontrôle *Trichoderma atroviride* a été exposé à plusieurs reprises à un laser à lumière bleue et analysé à différents moments en ce qui concerne la production d'enzymes, le contenu en silicium soluble, le contenu phénolique ainsi que l'activité antioxydante. L'angle de contact et la tension interfaciale ont également été évalués. Les structures morphologiques ont été examinées par microscopie optique. Nous avons également étudié le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Nous avons examiné la dégradation de la matrice lignocellulosique par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), diffraction des rayons X (XRD) et microscopie électronique à balayage avec analyse par dispersion d'énergie (SEM-EDX). Il a été constaté que l'exposition de *Trichoderma atroviride* à un laser modéré à lumière bleue pendant trois séances de 60 secondes chacune, à des intervalles de temps différents, entraîne une augmentation de l'activité enzymatique. Le niveau le plus élevé de production de cellulase et de protéase a été observé après trois séances d'irradiation. Certains effets semblent suivre un comportement hormétique pour la production d' α -amylase. Après détermination de l'activité de LPMO, les meilleurs résultats ont été obtenus à une faible quantité avant la troisième irradiation, mais les valeurs étaient sous contrôle. De plus, l'augmentation du contenu en silicium soluble dans la culture de *Trichoderma* après l'irradiation a mis en évidence une amélioration de la décomposition de la matrice lignocellulosique de la paille de riz, confirmée par l'analyse FTIR par la réduction des vibrations des liaisons amides et hydrogènes, ainsi que par l'analyse XRD par l'augmentation de la cristallinité de la paille de riz incubée avec *T. atroviride* irradié. De plus, l'irradiation améliore la

sporulation de *Trichoderma* et modifie les forces de cohésion et d'adhérence du milieu de culture.

Le **sous-chapitre 4.3** a suivi **les effets de l'irradiation à la lumière laser bleue du cocktail enzymatique de *Trichoderma atroviride* et *Trichoderma harzianum* cultivé en présence de paille de riz en faible quantité sur les graines de haricot Mungo**. À la suite des traitements, aucune variation statistiquement significative de la longueur des radicelles des plantules de haricot mungo n'a été observée par rapport au témoin, que ce soit en absence ou en présence de stress salin. En l'absence de stress salin, le témoin non irradié a conduit à une diminution notable de la longueur de l'hypocotyle. Sous stress salin, le milieu de culture a entraîné une réduction significative de la longueur de l'hypocotyle, surtout dans le traitement avec le milieu de culture de *T. harzianum* irradié. La hauteur des plantules a été considérablement réduite en présence de stress salin, particulièrement dans le traitement avec le milieu de culture de *T. harzianum* irradié. Les traitements utilisant le milieu de culture des souches de *Trichoderma* ont eu un impact significatif sur l'activité de l' α -amylase dans les plantules de haricot mungo. En absence de stress salin, le milieu de culture de *T. harzianum* irradié a significativement augmenté l'activité de l' α -amylase. En présence de stress salin, tant le témoin irradié que les traitements avec le milieu de culture de *T. harzianum* et *T. atroviride* ont conduit à des augmentations significatives de l'activité de l' α -amylase, avec des valeurs maximales observées pour *T. harzianum* irradié. En ce qui concerne l'activité de la pompe à protons (PPP), les traitements avec le milieu de culture des souches de *Trichoderma* ont significativement influencé l'activité de cette pompe dans les plantules de haricot mungo. En absence de stress salin, une augmentation du niveau de H^+ extracellulaire a été notée dans les traitements avec le témoin irradié, ainsi que les milieux de culture de *T. atroviride* non irradié, *T. atroviride* irradié et *T. harzianum* non irradié. En présence de stress salin, les niveaux les plus élevés de H^+ extracellulaire ont été enregistrés dans les traitements avec le milieu de culture de *T. atroviride* et *T. harzianum* irradié. En l'absence de stress salin, les traitements avec le milieu de culture des souches de *Trichoderma* ont significativement augmenté le contenu de L-proline dans les plantules. En présence de stress salin, la plupart des variantes expérimentales ont maintenu des niveaux similaires de L-proline par rapport à l'absence de stress. Le stress oxydatif, mesuré par les niveaux de MDA, a augmenté suite aux traitements avec le milieu de culture de *Trichoderma*, et l'irradiation a significativement réduit les MDA, en particulier chez *T. harzianum* irradié, indiquant une adaptation potentielle au stress salin. L'analyse de l'intensité de fluorescence des ROS avec H_2DCFDA a montré qu'en l'absence de stress salin, les traitements avec le témoin irradié et non irradié ont augmenté la quantité de ROS intracellulaires. En présence de stress salin, l'irradiation des souches a eu un effet biostimulant, réduisant significativement les ROS, en particulier chez *T. atroviride* irradié et *T. harzianum* irradié. L'analyse des racines de haricots Mung traitées au sel et aux milieux de culture contenant les souches d'intérêt a montré une réduction de la formation des espèces réactives de l'oxygène ($\cdot O_2^-$), mise en évidence par une faible intensité de la couleur formée par le NBT. Les traitements avec les champignons d'intérêt ont eu un effet

biostimulant, atténuant l'impact négatif du stress salin, suggérant le potentiel bénéfique de ces traitements dans la gestion du stress oxydatif induit par le sel.

Le **sous-chapitre 4.4** a étudié **les effets des mimiques fluorescentes de strigolactones sur les souches de *Trichoderma***. Six souches de *Trichoderma* ont été testées. Toutes les SL testées ont eu un effet sur l'abondance de la ramification des hyphes, à l'exception de SL 21 sur *T. harzianum* E6 et *T. atroviride* à des concentrations plus élevées. En ce qui concerne le diamètre des colonies, il a été observé que certaines strigolactones, en particulier le mimique SL 21, ont légèrement stimulé sa croissance pour les souches *T. asperellum* T36 et *T. harzianum* Td50b. Malheureusement, il n'a pas été possible de mesurer le diamètre des quatre autres souches restantes *Trichoderma atroviride* P1 ATCC 74058, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma harzianum* T22 (ATCC 2084), *Trichoderma harzianum* T95 (ATCC 6085) car les hyphes couvraient presque toute la plaque au troisième jour d'incubation. Les tests des champignons ont été réalisés en deux étapes, et pour les dernières souches (*T. asperellum* T36 et *T. harzianum* Td50b), la croissance radiale a été mesurée le deuxième jour d'incubation.

Le dernier **sous-chapitre 4.5**, "**Effets de la lumière laser bleue et des mimiques de strigolactones fluorescentes sur les souches de *Trichoderma***", décrit comment les cultures sous différentes longueurs d'onde de lumière, ainsi qu'en présence de strigolactones, affectent le comportement des souches de *Trichoderma* en fournissant des données sur la croissance radiale dépendante de la lumière \pm strigolactone, le comportement de conidiation et les activités mycoparasitaires. La mouillabilité des spores a également été évaluée. Cette étude a montré que tant *T. asperellum* T36 que *T. harzianum* Td50b sont capables de détecter et de répondre à différents stimuli tels que les mimiques de strigolactones ou les traitements à la lumière laser bleue. Ces stimuli ont eu un impact sur la différenciation, l'activité mycoparasitaire ainsi que sur la caractérisation de la mouillabilité des spores. Bien que le test au toluène ait amplifié le caractère hydrophobe des spores pour ces deux traitements, les analyses basées sur la détermination des angles de contact et de la tension interfaciale ont suggéré que les spores pourraient avoir plutôt un caractère amphiphile.

Le **chapitre V**, intitulé "**Effets biostimulants des chlamydo-spores de *Trichoderma*, appliqués seuls ou en combinaison avec des mimiques de strigolactones**", est consacré à l'étude des effets biostimulants des chlamydo-spores de *Trichoderma* sur les plantes, lorsqu'ils sont appliqués seuls ou en combinaison avec des mimiques de strigolactones. L'étude a pour objectif de comprendre comment ces facteurs affectent la croissance et le développement des plantes, ainsi que les relations entre les plantes et les micro-organismes présents dans le sol.

Plusieurs stratégies promeuvent la colonisation de la rhizosphère par les souches bénéfiques de *Trichoderma* originaires du sol. L'une de ces stratégies consiste en la pulvérisation foliaire de suspensions contenant des quantités élevées de chlamydo-spores - des spores dotées de structures de paroi cellulaire épaisse qui les rendent très résistantes aux conditions environnementales difficiles. La biomasse de *Trichoderma* a été produite par culture sur un milieu à base de maïs et comparée à celle produite sur Potato Dextrose Broth (PDB) par des analyses microscopiques et thermogravimétriques. Les analyses ont révélé une augmentation du contenu en

chlamydospores et une plus grande thermostabilité dans la biomasse fongique produite sur milieu de maïs. La suspension riche en chlamydospores de *Trichoderma* a été pulvérisée sur les feuilles de melon amer (*Momordica charantia*) à deux concentrations d'inoculum, 10^6 et 10^8 UFC/mL. L'effet de ces traitements sur les paramètres physiologiques des plantes, les pigments photosynthétiques des feuilles, le contenu en polyphénols et flavonoïdes, les activités antioxydantes des feuilles et des fruits, ainsi que la production ont été comparés au témoin (plantes pulvérisées avec de l'eau) et au traitement expérimental impliquant la pulvérisation avec 10^8 UFC/mL de propagules produites en PDB. L'effet des suspensions riches en chlamydospores sur les paramètres physiologiques des plantes a été plus prononcé et de plus longue durée par rapport aux autres traitements. Le traitement avec la suspension riche en chlamydospores a augmenté l'accumulation de polyphénols et de flavonoïdes dans les feuilles (de 17% et 50%, respectivement) et dans les fruits (de 18% et 31%, respectivement) et a augmenté l'activité antioxydante. Le traitement avec *Trichoderma* a augmenté la production de +25,33 à 53,07%. L'application des traitements foliaires avec les suspensions de *Trichoderma* n'a pas modifié la cytocompatibilité des extraits de fruits déterminée sur les cellules L929.

Dans ce chapitre, l'impact des solutions de mimiques de strigolactones sur la croissance et le développement des plantes d'*Arabidopsis thaliana* a également été étudié. À la suite de l'expérience menée, nous avons pu constater que les deux SL fluorescentes (SL20 et 21) ont eu un effet stimulant plus important sur la croissance des plantes que le GR24.

Dans le **chapitre VI**, sont présentées les conclusions principales, les innovations découvertes et les potentielles applications des résultats de cette thèse. Les éléments novateurs suivants sont soulignés : l'étude de l'activité de divers mimétiques de strigolactone, pour lesquels aucune donnée n'est disponible sur leur impact sur la croissance et la morphologie des colonies de champignons phytopathogènes, ainsi que sur *Trichoderma*, à notre connaissance.

Il s'agit de la première recherche à rapporter les effets du laser bleu sur les activités de la cellulase et de la protéase, ainsi que sur la taille des conidies chez *Trichoderma*. De plus, l'irradiation améliore la formation des clamidospores de *Trichoderma* et modifie les forces de cohésion et d'adhérence du milieu de culture.

Une autre innovation notable est l'application foliaire d'une formulation de clamidospores d'un consortium de *Trichoderma* sur *Momordica charantia*, qui favorise la colonisation de la phyllosphère et induit un effet biostimulant durable, surtout lorsque la biomasse de *Trichoderma* contient une plus grande quantité de clamidospores.

