



**HAL**  
open science

# Méthodes de caractérisation innovantes pour la recherche de molécules à potentiel alléopathique

Gwenaëlle Flieller

► **To cite this version:**

Gwenaëlle Flieller. Méthodes de caractérisation innovantes pour la recherche de molécules à potentiel alléopathique. Chimie analytique. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAF022 . tel-03937412

**HAL Id: tel-03937412**

**<https://theses.hal.science/tel-03937412v1>**

Submitted on 13 Jan 2023

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES ED222**  
**UMR 7178**

**THÈSE** présentée par :  
**Gwenaëlle FLIELLER**

soutenue le : **25 novembre 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie analytique

**Méthodes de caractérisation innovantes  
pour la recherche de molécules à  
potentiel allélopathique**

**THÈSE dirigée par :**  
**M. ENNAHAR Saïd**

Professeur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**  
**Mme DESTANDEAU Emilie**  
**M. MICHEL Thomas**

Professeur, Université d'Orléans  
Maître de conférences, Université de Nice

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**  
**M. GAQUEREL Emmanuel**  
**M. GUILLEMIN Jean-Philippe**  
**Mme VALOIS Ludivine**

Professeur, Université de Strasbourg  
Professeur, Institut Agro de Dijon  
Maître de conférences, Université de Strasbourg



---

# REMERCIEMENTS

---



## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Saïd Ennahar d'avoir accepté de diriger cette thèse dans un domaine un peu différent du sien. Je vous remercie pour votre confiance et votre patience.

Je souhaite remercier chaleureusement Ludivine Valois. Merci pour tout ce que tu m'as appris depuis mon stage en M1, merci de m'avoir proposé un sujet de thèse correspondant à mes envies et de m'avoir soutenue et encouragée pendant cette thèse. Merci pour toutes tes relectures d'articles, de présentation, de manuscrit. Merci pour ta bienveillance, ta patience et tes conseils. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite...

Je remercie ensuite le Pr Emilie Destandeu et le Dr Thomas Michel d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en qualité de rapporteurs et les Pr Emmanuel Gaquerel et Jean Philippe Guillemain d'avoir accepté d'être membres du jury.

Je tiens à remercier également les personnes avec qui j'ai échangé pendant plus de trois ans dans l'équipe CAMBAP. Merci Sonia Lordel Madeleine d'avoir été la première à me faire confiance, merci de m'avoir acceptée en stage de M2 même si je ne voulais pas faire de thèse au début. Je te souhaite de belles années dans ta nouvelle carrière. Merci Martine Bergaentzlé pour le temps que tu as consacré à m'expliquer les statistiques et comment fonctionnait R. Même si nos après-midi réunion se soldaient souvent par des manip supplémentaires à effectuer ou des difficultés sur R, ta bonne humeur et tes encouragements ont rendus ces moments moins difficiles. Merci à Aurélie Urbain pour tes nombreux conseils pour l'HPLC préparative et pour ta bonne humeur. Merci Laurence pour tous vos conseils sur la culture végétale *in vitro*, c'était un plaisir de travailler avec vous sur cet aspect du projet. Je remercie également Quentin et Nathalie, les moments passés avec vous au laboratoire ont été ponctués de rire.

Une pensée toute particulière aux anciens thésards du laboratoire. Merci Zélie de m'avoir transmis ce que tu savais de l'organisation du labo, merci pour tous tes précieux conseils. C'était également super de pouvoir parler tricot pendant les pauses café et midi, un jour je réussirai à finir tes chaussettes. Merci Clément pour les entraînements au concours de l'école doctorale et pour le soutien apporté durant les deux premières années de cette thèse. Nos discussions sur des sujets tellement divers ont rythmé les journées au labo.

Je tiens à remercier tous les stagiaires qui ont participé à ce projet de thèse ou qui étaient juste de passage au labo. Merci à Aurore, Sara, Dorian et Camille, votre implication et votre intérêt ont permis au projet d'avancer beaucoup plus vite. Magali, Augustin, Pauline et Doori, je suis contente que nos chemins se soient croisés. Je vous souhaite à toutes et tous de la réussite

## Remerciements

dans la suite de vos études, le début de vos carrières professionnelles et bon courage à Sara et Augustin qui commencent une thèse, vous verrez trois ans ça passe vite finalement.

Je souhaite remercier mes amis qui, de près ou d'un peu plus loin, m'ont soutenue pendant ces trois années. Hélène et Mamour, merci pour votre amitié qui dure depuis le lycée, les moments passés avec vous ont été des bouffées d'air frais (vosgien) dans un quotidien chargé (et un peu trop strasbourgeois). Marianne, Cloé et Floriane, c'était un plaisir d'avoir de vos nouvelles pendant ces trois années de thèse. Un remerciement tout particulier pour Elora, ma partenaire de VégéLab, on en a eu des galères mais aussi des crises de fou rire, et tu vois on sera aussi venues à bout de nos thèses en même temps. Merci pour ton accueil pendant le confinement et merci d'être une amie avec qui je peux discuter de tout (pendant des heures). Merci Chloé, Jo, Julien, Sandra et Mimi, pour nos soirées jeux, nos papotages et nos LCs, vos encouragements ont été un véritable soutien pendant toute cette dernière année.

Je remercie également ma famille et plus particulièrement mes parents. Merci de m'avoir poussée à faire des études longues et d'avoir toujours cru en moi peu importe les échecs. Merci maman d'être mon roc. Merci tonton pour le soutien apporté ces derniers mois de rédaction pas si faciles. Une pensée émue, pour mes grands-mères et mon grand-père.

Pour finir, je souhaite remercier mon amour, celui qui partage ma vie depuis 10 ans maintenant, merci d'être là dans les bons comme dans les mauvais moments. Ton soutien et tes bons petits plats étaient essentiels durant ces mois de rédaction. Merci de m'aider à relativiser, et d'être l'étincelle de joie et d'imprévu dans un quotidien qui serait, sans toi, bien trop fade. Merci d'être toi. J'ai hâte de voir ce que nous réserve les dix années qui arrivent.

---

LISTE DES  
COMMUNICATIONS  
ORALES ET ECRITES

---





Communications écrites et orales :

---

**Publication dans des journaux internationaux :**

Flieller G., Riffault-Valois L., Bergaentzlé M., & Ennahar S. (2022). Fast and Reproducible 96-Well Plate-Based Method for the Evaluation of the Antigerminative Potential of Plant Extracts and Phytotoxic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(25), 7842-7850.

**Communications orales :**

Riffault-Valois L., Flieller G., Bergaentzlé M., Ennahar S. Couplage entre l'HPLC et la mesure de la germination pour la recherche de nouveaux bioherbicides, Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie : 7<sup>ème</sup> journée thématique du Club de Chromatographie Ouest Atlantique, 16 novembre 2021, en ligne.

Flieller G., Riffault-Valois L., Bergaentzlé M., Ennahar S. Développement d'une méthode de couplage par HPLC pour la mesure de l'activité herbicide. Association Francophone des Sciences Séparatives Club Grand Est : 2<sup>ème</sup> journée scientifique 2022, Sciences séparatives en phytochimie, 12 mai 2022, Strasbourg.

Flieller G., Riffault-Valois L., Bergaentzlé M., Ennahar S. Development of a coupling method between HPLC and herbicidal activity measurement, Phytochemical Society of Europe, Trends in Natural Products Research: A young scientists' meeting, 23-26 mai 2022, Kolymbari, Crète, Grèce.

Flieller G., Riffault-Valois L., Bergaentzlé M., Ennahar S., Développement d'un couplage innovant pour la découverte de molécules à potentiel allélopathique, Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie : rencontre virtuelle, 12-13 juillet 2022, en ligne.

**Communications par affiche :**

Flieller G., Riffault-Valois L., Bergaentzlé M., Lordel-Madeleine S., Ennahar S. Couplage innovant HPLC-test d'activité antigerminative pour la recherche de molécules à potentiel bioherbicide, 14<sup>ème</sup> Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages de l'Association Francophone des Sciences Séparatives, 5-7 octobre 2021, Paris.

Flieller G., Riffault-Valois L., Bergaentzlé M., Ennahar S. Allelopathy, a model to find new bioherbicides, Fédération Recherche Environnement et Durabilité, Symposium 2021, 20 – 22 octobre 2021, Strasbourg.

## Communications écrites et orales

Riffault-Valois L., Flieller G., Bergaentzlé M., Ennahar S. Development of a HPLC fractionation – phytotoxicity activity test hyphenated method for the discovery of new bioherbicide candidates, Analytics 2022, 5-8 septembre 2022, Nantes

---

# SOMMAIRE

---



Sommaire

---

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>13</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>21</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>25</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>35</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>39</b>
<b>CHAPITRE I - INTRODUCTION</b> .....	<b>43</b>
1. LES HERBICIDES : CONTEXTE, UTILISATION, AVANTAGES ET PROBLEMATIQUES :.....	43
1.1 <i>Contexte : la lutte contre les plantes adventices</i> : .....	43
1.1.1 Généralités sur les plantes adventices :.....	43
1.1.2 Utilité des plantes adventices :.....	44
1.1.3 Désagréments causés par les plantes adventices :.....	44
1.2 <i>Utilisation des herbicides</i> : .....	45
1.2.1 Historique et mise en place :.....	45
1.2.2 Moment et méthode d'application des herbicides :.....	46
1.2.3 Les modes d'action des herbicides : .....	47
1.2.3.1 Impact sur l'activation des espèces réactives de l'oxygène par la lumière :.....	48
1.2.3.2 Impact sur le métabolisme cellulaire : .....	50
1.2.3.3 Impact sur la division cellulaire et la croissance : .....	52
1.2.4 Sélectivité : .....	53
1.2.5 Les avantages des herbicides : .....	54
1.2.6 Les problèmes causés par les herbicides : .....	54
1.2.6.1 Problèmes environnementaux et en santé humaine : .....	54
1.2.6.2 La résistance aux herbicides : .....	55
2. UNE ALTERNATIVE – LES PRODUITS DE BIOCONTROLE ? .....	57
2.1 <i>Allélopathie</i> : .....	59
2.2 <i>Mécanismes d'action des composés allélopathiques ayant une activité bioherbicide</i> : .....	62
2.3 <i>Les méthodes utilisées pour la mesure de la phytotoxicité de produits naturels d'origine végétale</i> : ...	63
2.3.1 La plante entière – « Plant box Method » :.....	64
2.3.2 La poudre de plante – Méthode sandwich et Dish Pack : .....	65
2.3.3 Les extraits de plantes – Méthode en boîte de Petri sur papier filtre :.....	66
2.3.4 Autres tests <i>in vitro</i> :.....	67
3. IDENTIFICATION ET PRODUCTION DE MOLECULES ACTIVES : .....	70
3.1 <i>Chromatographie en phase Liquide Haute Performance</i> :.....	70
3.1.1 Principe :.....	70
3.1.2 Couplage HPLC - fractionnement – détection d'activité : .....	72
3.2 <i>Production de métabolites spécialisés grâce à la culture végétale in vitro</i> : .....	73
3.2.1 Principe/ avantages :.....	73
3.2.2 Hormones utilisées en culture végétale <i>in vitro</i> : .....	75
3.2.3 Élicitation : .....	76
4. OBJECTIFS DU PROJET DE THESE :.....	77

**CHAPITRE II - DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE DETECTION DE L'ACTIVITE BIOHERBICIDE EN PLAQUE 96 PUIITS..... 81**

1. INTRODUCTION AUX 2 TESTS UTILISES ET GENERALITES SUR LA VALIDATION DE LA METHODE : .....	81
1.1 <i>Le test en boîte de Petri sur papier filtre : mise en place et problématiques</i> : .....	81
1.2 <i>Mise au point de la méthode en plaque 96 puits</i> : .....	83
1.3 <i>Validation de la méthode</i> : .....	84
1.4 <i>Les tests statistiques utilisés dans les études allélopathiques et autre possibilité</i> : .....	87
2. TESTS PRELIMINAIRES : .....	89
2.1 <i>Impact du support sur la germination des graines de cresson</i> : .....	89
2.1.1 Germination des graines avec de l'agar comme support : .....	89
2.1.2 Germination des graines avec du papier filtre comme support .....	91
2.1.3 Germination des graines en milieu liquide sans support : .....	92
2.2 <i>Évaluation du potentiel antigerminatif de molécules témoins</i> : .....	93
2.2.1 Quantité de molécules à déposer : .....	93
2.2.1.1 Références obtenues avec la méthode en boîte de Petri : .....	93
2.2.1.2 Adaptation en plaque 96 puits : .....	94
2.2.2 Volume de resububilisation : .....	95
2.2.3 Techniques d'évaporation : .....	96
2.3 <i>Mesure de la germination des graines de cresson</i> : .....	98
3. VALIDATION DE LA METHODE DEVELOPEE EN PLAQUE 96 PUIITS : .....	99
3.1 <i>Validation avec un standard, la lawsonie</i> : .....	101
3.2 <i>Réduction du nombre de graines</i> : .....	104
3.3 <i>Application du test à un extrait de plante</i> : .....	106
3.4 <i>Activité antigerminative du glyphosate, du 2,4-D et de la 2-MNQ</i> : .....	108
3.5 <i>Utilisation d'autres espèces de plantes cibles</i> : .....	109
3.5.1 Sélection des graines et conditions de culture : .....	109
3.5.1.1 Les dicotylédones : .....	109
3.5.1.2 Les monocotylédones : .....	112
3.5.2 Impact de la lawsonie sur la germination de différentes espèces de plantes : .....	113
3.5.3 Impact du 2,4-D sur la germination de différentes espèces de plantes : .....	115
3.6 <i>Élongation racinaire</i> : .....	116
4. COUPLAGE AVEC L'HPLC : .....	118
4.1 <i>Séparation chromatographique</i> : .....	119
4.2 <i>Fractionnement</i> : .....	120
4.3 <i>Tests antigerminatifs</i> : .....	120
4.4 <i>Application à un extrait éthanolique d'Impatiens glandulifera</i> : .....	121
5. CONCLUSIONS : .....	123

**CHAPITRE III - ETUDE DE L'ACTIVITE PHYTOTOXIQUE DE LA BALSAMINE DE L'HIMALAYA ..... 127**

1. LA BALSAMINE DE L'HIMALAYA : .....	127
1.1 <i>Description de la plante</i> .....	127
1.2 <i>Une plante invasive</i> : .....	127
1.3 <i>Composition phytochimique de la balsamine de l'Himalaya</i> : .....	128

## Sommaire

1.4 Potentiel allélopathique :	130
2. CULTURE <i>IN VITRO</i> DE LA BALSAMINE DE L'HIMALAYA :	131
2.1 Germination des graines :	132
2.1.1 Potentiel de germination :	133
2.1.2 Conditions de culture :	133
2.1.3 Conditions de stérilisation :	134
2.1.4 Croissance des plantules à partir des graines :	135
2.2 Mise en place des cultures de cals :	136
2.2.1 Essai avec les plantules obtenues à partir des graines et avec des graines germées :	137
2.2.2 Callogenèse à partir de plants sauvages de balsamine de l'Himalaya :	138
2.2.2.1 Tests préliminaires de stérilisation et de callogenèse :	138
2.2.2.2 Test des différents explants /Test des différentes balances hormonales :	140
2.2.2.3 Choix de la lignée pour mettre en place les suspensions cellulaires :	142
2.2.3 Mise en culture des suspensions cellulaires :	143
2.2.3.1 Mise en suspension des cals :	143
2.2.3.2 Multiplication des suspensions cellulaires :	144
2.2.3.3 Mise à l'obscurité :	144
2.2.3.4 Courbe de croissance des suspensions cellulaires :	145
2.2.4 Micro-propagation – Obtention de plantules :	146
2.2.4.1 Obtention de plantules :	146
2.2.4.2 Multiplication des plantules :	147
3. ÉVALUATION DE L'ACTIVITE DES DIFFERENTES PARTIES DE LA PLANTE :	148
3.1 Extraction des différentes parties de la plante :	148
3.2 Activité des différents extraits :	149
3.2.1 Inhibition de la germination :	149
3.2.2 Inhibition de l'élongation racinaire :	152
3.2.3 Profil phytochimique des extraits éthanoliques des différentes parties de la plante et des suspensions cellulaires :	154
3.2.4 Microfractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique de feuilles :	157
3.2.4.1 Activité antigerminative des microfractions :	157
3.2.4.2 Identification des molécules présentes dans les fractions actives :	159
3.2.5 Fractionnement par HPLC préparative :	167
3.2.5.1 Transposition du gradient analytique :	168
3.2.5.2 Séparation et collecte par HPLC préparative :	169
4. CONCLUSIONS :	174
<b>CHAPITRE IV - RECHERCHE DE COMPOSES A POTENTIEL ALLELOPATHIQUE DANS DES PLANTES INVASIVES, ADVENTICES ET ORNEMENTALES VIGOUREUSES.....</b>	<b>177</b>
1. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIE DES DIFFERENTES PLANTES D'INTERET :	177
1.1 Le fraisier des Indes :	178
1.2 La benoîte commune :	179
1.3 Le pourpier commun :	180
1.4 La potentille quintefeuille :	181
1.5 Le gaillet commun et gaillet gratteron :	182
1.6 Le thuya :	184
2. ÉVALUATION DE L'ACTIVITE DES DIFFERENTES PLANTES :	185



## Sommaire

2.1	<i>Extraction des parties aériennes des plantes récoltées :</i>	185
2.2	<i>Activité des différents extraits :</i>	186
2.2.1	<i>Impact sur la germination :</i>	186
2.2.2	<i>Impact sur l'élongation racinaire :</i>	188
3.	<b>ÉTUDES PHYTOCHIMIQUES PRELIMINAIRES DES EXTRAITS ACTIFS :</b>	190
3.1	<i>Extrait à l'acétate d'éthyle de potentille :</i>	190
3.2	<i>Extraits de thuya :</i>	191
4.	<b>CONCLUSIONS :</b>	193
	<b>CHAPITRE V - CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</b>	<b>197</b>
	<b>CHAPITRE VI - MATERIEL ET METHODES</b>	<b>205</b>
1.	<b>TESTS ANTIGERMINATIFS ET CRIBLAGE :</b>	205
1.1	<i>Provenance des solvants, étalons, réactifs et références des appareils :</i>	205
1.2	<i>Tests antigerminatifs – Mise au point de la méthode :</i>	205
1.2.1	<i>Graines utilisées :</i>	205
1.2.2	<i>Tests préliminaires :</i>	206
1.2.2.1	<i>Test agar :</i>	206
1.2.2.2	<i>Évaluation du potentiel antigerminatif de molécules témoins :</i>	206
1.2.2.3	<i>Volume de resububilisation :</i>	206
1.2.2.4	<i>Techniques d'évaporation :</i>	207
1.2.2.5	<i>Mesure de la germination des graines de cresson :</i>	207
1.3	<i>Tests antigerminatifs – application de la méthode :</i>	208
1.3.1	<i>Utilisation de différentes graines cibles et molécules testées :</i>	208
1.3.2	<i>Évaluation de l'activité phytotoxique de la balsamine et d'autres plantes invasives, adventices ou ornementales</i>	209
1.3.2.1	<i>Matériel végétal et extraction :</i>	209
1.3.2.2	<i>Évaluation de l'activité des extraits de plantes :</i>	209
2.	<b>ANALYSE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS ET COUPLAGE :</b>	210
2.1	<i>HPLC analytique :</i>	210
2.2	<i>HPLC préparative :</i>	211
2.3	<i>Spectrométrie de masse :</i>	213
3.	<b>ANALYSES STATISTIQUES :</b>	213
4.	<b>CULTURE <i>IN VITRO</i> :</b>	214
4.1	<i>Provenance des solvants, étalons, réactifs et références des appareils :</i>	214
4.2	<i>Germination des graines d'<i>Impatiens glandulifera</i> :</i>	215
4.2.1	<i>Milieux utilisés :</i>	215
4.2.2	<i>Protocole de stérilisation :</i>	215
4.2.3	<i>Protocole de stérilisation 1 :</i>	215
4.2.4	<i>Protocole de stérilisation 2 :</i>	216
4.3	<i>Callogenèse :</i>	216
4.3.1	<i>Milieux utilisés :</i>	216
4.3.2	<i>Protocole de stérilisation :</i>	217
4.3.3	<i>Mise en culture et repiquage :</i>	217
4.3.4	<i>Taux de contamination et aire des cals :</i>	218
4.3.5	<i>Courbe de croissance :</i>	218

## Sommaire

<i>4.4 Suspensions cellulaires</i> : .....	218
4.4.1 Milieu de culture :.....	218
4.4.2 Mise en culture et repiquage :.....	218
4.4.3 Courbe de croissance :.....	219
<i>4.5 Micropropagation</i> : .....	219
4.5.1 Milieu de culture :.....	219
4.5.2 Protocole de stérilisation : .....	219
<b>CHAPITRE VII - GLOSSAIRE</b> .....	<b>223</b>
<b>ANNEXE 1 : HRAC : MODE OF ACTION CLASSIFICATION</b> .....	<b>229</b>
<b>ANNEXE 2 : LISTE DES PRODUITS PHYTOPHARMACEUTIQUES DE BIOCONTROLE, AU TITRE DES ARTICLES L-253-5 ET L.253-7 DU CODE RURAL ET DE LA PECHE MARITIME</b> .....	<b>230</b>



---

# ABBREVIATIONS

---



Abréviations

---

2,4-D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
2 -MNQ	2-Methoxy-1,4-naphtoquinone
ACCase	Acétyl CoA carboxylase
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
AESA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
AHAS ou ALS	Acétohydroxyacide synthase ou acétolactate synthase
AIA	Acide 3-indole acétique
ANA	Acide naphtalène acétique
ANSES	Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BAP	Benzyladenine
CAMBAP	Chimie Analytique des Molécules BioActives et Pharmacognosie
CG	Contrôle de germination
CMR	Cancérigène Mutagène, Reprotoxique
CV <sub>FI</sub>	Coefficient de Variation de fidélité intermédiaire
CVIV	Culture végétale <i>in vitro</i>
CV <sub>r</sub>	Coefficient de Variation de répétabilité
D <sub>2</sub> O	Oxyde de deutérium ou eau lourde
DAD	<i>Diode Array Detector</i> - Détecteur à Barrette de Diodes
DEDL	Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC <sub>50</sub>	Concentration efficace 50
EPSP	5-EnolylPyruvyl-Shikimate 3-Phosphate
EPSPS	5-EnolylPyruvyl-Shikimate 3-Phosphate Synthase
GLM	Modèle Linéaire Généralisé
H <sub>2</sub> O	Eau
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Chromatographie Liquide Haute Performance
HRAC	<i>Herbicide Resistance Action Comitee</i> - Comité d'Action de la Résistance aux Herbicides
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> - Spectrométrie de Masse Haute Résolution
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol (propan-2-ol)

## Abréviations

IBA	Acide indole 3-butyrique
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice 50
IGR	<i>Impatiens glandulifera</i> Royle
KIN	Kinétine
<i>m/z</i>	Rapport masse/charge
MS	<i>Mass Spectrometry</i> - Spectrométrie de Masse
NADPH <sub>2</sub>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PEP	Phosphoénolpyruvate
pH	Potentiel Hydrogène
ppm	Partie par millions
PPM™	<i>Plant Preservative Mixture</i>
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> – Espèces réactives de l'oxygène
rpm	Rotation par minute
S3P	Shikimate-3-Phosphate
SCE	Somme des Carrés des Écarts
SEM	<i>Standard Error to the Mean</i> - Erreur type de la moyenne
ZEA	Zéatine

---

# LISTE DES FIGURES

---





## Liste des figures

---

Figure I-1 – Différentes étapes de la germination d’une graine .....	47
Figure I-2 – Cibles biologiques des herbicides décrits par le comité d’Action de la Résistance aux Herbicides avec en orange les cibles qui seront présentées dans ce manuscrit. Les chiffres en orange correspondent aux différentes catégories de cibles que les herbicides inhibent. Adapté de Délye <i>et al.</i> (2013).....	48
Figure I-3 – Structure chimique de l’atrazine (sous-catégorie 5), de la sulcotrione (sous-catégorie 27) et de l’amitrole (sous-catégorie 34) inhibant le fonctionnement du photosystème II et la synthèse des composés anti-oxydants : le tocophérol et le lycopène .....	49
Figure I-4 – Structure chimique du chlorsulfuron (herbicide de sous-catégorie 2) et du glyphosate (herbicide de sous-catégorie 9) inhibant la synthèse des acides aminés branchés et aromatiques par l’ALS et l’EPSPS.....	51
Figure I-5 – Structure chimique du diclofop-méthyle (A) et du métazachlore (B) .....	52
Figure I-6 – Structure des auxines naturelles et synthétiques dont certaines sont utilisées comme herbicides.....	53
Figure I-7 – Répartition des cas de résistances par groupes d’herbicides répertoriés en fonction du site d’action. En nuances de vert : résistance aux herbicides impactant le métabolisme cellulaire, en orange ; résistance aux herbicides impactant l’activation par la lumière des ROS, en bleu : résistance aux herbicides impactant la division cellulaire et la croissance. Adapté de Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. En ligne. Mercredi 22 juin2022.....	56
Figure I-8 – Nombre de publications par an d’après la base de données Web of Science pour les mots clés « allelopathy » en A et « bioherbicide » en B (Base de données, Web of Science) .....	60
Figure I-9 – Schéma des différents moyens de libération dans l’environnement des composés allélopathiques et quelques exemples. Adapté de Weir <i>et al.</i> (2004), et de De Albuquerque <i>et al.</i> (2011) .....	61
Figure I-10 – Comparaison de la structure de composés naturels phytotoxiques : la sorgoléone et la leptospermoné, avec une molécule biologique : la plastoquinone, ou un herbicide commercial : la sulcotrione. Adapté de Dayan <i>et al.</i> (2000).....	63
Figure I-11 – Schéma de la méthode « plant box ». (A) vue de profil de la boîte avec la plantule positionnée dans un coin de la boîte, (B) vue du dessus avec les numéros des graines déposées sur l’agar et qui sont à différentes distances de la plantule représentée par le S. Adaptée de Parvez <i>et al.</i> , (2003) .....	64
Figure I-12 – Schéma de la méthode « sandwich » en plaque 6 puits (en vert la poudre de plante, en jaune les couches d’agar). .....	65
Figure I-13 – Schéma de la méthode "Dish Pack" en plaque 6 puits, avec en vert la poudre de plante et en bleu la présence de papier filtre imbibé d’eau. Les distances entre les puits de mesure et le puits contenant la poudre de plante sont indiquées en noir.....	66
Figure I-14 - Schéma de la méthode en boîte de Petri sur papier filtre, avec en vert l’extrait de plante, en bleu la présence d’eau.....	66
Figure I-15 – Schéma général d’un système de chromatographie liquide à haute performance .....	70
Figure I-16 – Schéma des différentes parties d’un spectromètre de masse en tandem. Adapté de McLafferty, (1981) .....	72
Figure I-17 – Schéma des différentes étapes permettant d’obtenir des cultures de cellules indifférenciées, des plantules (micropropagation) ou des chevelus racinaires « hairy roots ».....	74
Figure I-18 – Structure des différentes cytokinines et de l’adénine. ....	76
Figure II-1 – Schéma du protocole utilisé pour le test de référence en boîte de Petri pour la mesure de l’activité antigerminative. ....	82

## Listes des figures

Figure II-2 – Étapes de la germination d’une graine de cresson, Adaptée de Müller <i>et al.</i> (2006) (A) graine de cresson avant germination (B) au bout de 6 h, rupture initiale du testa du micropyle, (C) au bout de 12 h rupture avancée du testa, (D) rupture de l’endosperme du micropyle. ....	83
Figure II-3 – Résumé des paramètres à optimiser pour la mise en place du test en plaque 96 puits utilisant des graines de cresson comme plante cible .....	84
Figure II-4 – Taux de germination moyen des graines de cresson au cours du temps en fonction des différents solvants ajoutés à l’agar. (8 graines par condition, 3 réplicats).....	90
Figure II-5 – Germination des graines de cresson en plaque 96 puits avec papier filtre utilisant 100 µL d’eau, après mise sur papier noir. Réalisée en duplicat (A-B). Le trait blanc en bas à droite représente 1 cm. ....	91
Figure II-6 – Schéma des différents paramètres à optimiser pour le développement de la méthode en plaque 96 puits.....	93
Figure II-7 – Taux de germination moyen des graines de cresson en fonction de la concentration en molécules testées et de la présence ou non de papier filtre dans les puits. ....	94
Figure II-8 – Taux de germination des graines de cresson en fonction des molécules testées, du test et du volume d’eau utilisé.....	96
Figure II-9 – Taux de germination des graines de cresson en fonction des solvants utilisés (A) et des molécules testées (B). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne pour 2 réplicats .....	97
Figure II-10 – Bilan des paramètres choisis pour la mise au point du test en plaque 96 puits. ....	98
Figure II-11 – Graines de cresson germant en conditions contrôles dans une boîte de Petri (A) et une fois déposées sur un papier noir (B). ....	99
Figure II-12 – Graines de cresson en conditions contrôle après 48h de germination (A), mesure de la racicule à l’aide d’ImageJ (B). ....	99
Figure II-13 – Comparaison des différentes étapes et des conditions utilisées pour l’application de la méthode en boîte de Petri (A) et de la méthode en plaque 96 puits (B). ....	101
Figure II-14 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en lawsone testée, de la méthode utilisée et du jour de l’expérimentation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l’erreur type à la moyenne pour 3 réplicats. Les * indiquent des différences significatives entre les valeurs obtenues d’après un test de Student au seuil $\alpha = 0,05$ .....	102
Figure II-15 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en lawsone et du nombre de graines utilisées par condition. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne pour 3 réplicats .....	105
Figure II-16 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en extrait éthanolique d’IGR et de la méthode utilisée avec 20 ou 12 graines par condition. Les taux de germination sont exprimés en moyenne ± erreur type de la moyenne de 3 réplicats. ....	106
Figure II-17 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en 2,4-D, 2-MNQ, glyphosate et lawsone. Le taux de germination est exprimé comme la moyenne ± erreur type de la moyenne de 3 réplicats. Les lettres en bleu indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en molécules d’intérêt. Les chiffres en vert indiquent une différences significatives (selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination obtenus à une concentration donnée en molécule. ....	109
Figure II-18 – Graines de pourpier (1), de pissenlit (2) de laitue (3-5) variété ‘reine de mai’ (3), ‘à couper’ (4) et ‘batavia’, de cresson (6) et de radis (7). Le trait noir en bas à gauche représente 5 mm.....	110

## Listes des figures

Figure II-19 – Taux de germination moyen (A) des différentes variétés de laitue cultivées à la lumière ou à l’obscurité pendant 48h à 25°C. ....	111
Figure II-20 – Graines de millet (1), de ray grass anglais (2), de blé tendre (3) et d’avoine noire (4). Le trait noir en bas à gauche représente 5 mm. ....	112
Figure II-21 – Taux de germination des graines de blé, laitue, raids, et cresson en fonction de la concentration en lawsone. Le taux de germination est exprimé comme la moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne de 3 réplicats. Les lettres en bleu indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination des graines en fonction de la concentration en lawsone. Les chiffres en vert indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination obtenus entre les 4 espèces à une concentration donnée en lawsone. ....	114
Figure II-22 – Taux de germination des graines de blé, laitue, radis, et cresson en fonction de la concentration en 2,4-D. Le taux de germination est exprimé comme la moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne de 3 réplicats. Les lettres en bleu indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ %) entre les taux de germination des graines d’une espèce en fonction de la concentration en 2,4-D. Les chiffres en vert indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination obtenus pour les 4 espèces à une concentration donnée en 2,4-D. ....	115
Figure II-23 – Germination des graines de cresson au contact de concentrations croissantes de lawsone (A) : témoin négatif éthanol, (B) 0,01 mmol/L, (C) 0,1 mmol/L, (D) 0,5 mmol/L, (E) 1 mmol/L, (F) 2 mmol/L, (G) 3 mmol/L, (H) contrôle de germination sans solvant. ....	116
Figure II-24 – Longueur de la radicule des graines de cresson en fonction de la concentration en lawsone testée et du jour de l’expérience. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ erreur type de la moyenne des 3 répétitions faites le même jour avec 12 graines par condition. ....	117
Figure II-25 – Schéma des différentes étapes nécessaires au couplage séparation chromatographique – test biologique. ....	118
Figure II-26 – Paramètres à définir pour la mise en place du couplage séparation chromatographique - détection de l’activité bioherbicide ....	119
Figure II-27 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l’extrait éthanolique d’IGR (en noir), blanc éthanol (en bleu) par HPLC-DAD et gradient d’élution utilisé en violet (gradient 1) ....	119
Figure II-28 – Schéma des différentes étapes du couplage HPLC – tests antigerminatifs avec indiqués en vert les différents paramètres optimisés. ....	121
Figure II-29 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l’extrait éthanolique d’IGR (en noir) par HPLC-DAD (gradient 1) ....	122
Figure II-30 – Germination des graines de cresson au contact des fractions de l’extrait éthanolique d’IGR. Les encadrés bleus désignent les zones d’inhibition de la germination (A et B désignent les deux réplicats). ....	122
Figure III-1 – Photo d’un parterre d’IGR à Gerstheim à gauche (lieu de récolte) et d’une fleur d’IGR à droite	127
Figure III-2 – Schéma général de mise en culture <i>in vitro</i> à partir de graines ....	132
Figure III-3 – Bilan des résultats obtenus pour le test de stratification des graines d’IGR. ....	134
Figure III-4 – Taux de germination des graines d’IGR en fonction des différents protocoles de stérilisation testés. Les données sont exprimées en moyenne des taux de germination de 3 boîtes contenant chacune 60 graines. .	135
Figure III-5 – Développement des plantules d’IGR à l’obscurité pendant 21 jours (A) et développement de la même plantule après 4 jours à la lumière (B). Le trait noir représente 1 cm. ....	136
Figure III-6 – Différentes étapes permettant l’initiation de la callogenèse à partir de graines germées, de plantules et une fois le protocole de stérilisation optimisé à partir de plant d’IGR sauvages. ....	136

## Listes des figures

Figure III-7 – Protocole de mise en culture des explants à partir de plantes sauvages .....	139
Figure III-8 – Évolution des explants foliaires après 4 jours de culture sur 3 milieux différents contenant ou non du PPM. ....	139
Figure III-9 – Évolution des cals de la lignée 1 au fil des repiquages sur milieu ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L) à partir d'explants foliaires : (1) à 12 semaines après la mise en culture, (2) repiqués sur un milieu frais, (3) un mois plus tard, (4) repiqués de nouveau sur un milieu frais sans PPM, (5) de nouveau après un mois de culture. Le trait noir représente 1 cm. ....	140
Figure III-10 – Aire (en cm <sup>2</sup> ) des cals sur milieu 2,4-D/BAP (1,5 mg/mL/0,5 mg/mL) et ANA/BAP (1,5 mg/mL/0,5 mg/mL) après mise en culture (1) et après 28 ou 20 jours de culture (2) et taux de croissance des cals. ....	142
Figure III-11 – Courbes de croissance des deux lignées de cals en fonction du temps de culture (A) lignée 1 et (B) lignée 2. ....	143
Figure III-12 – Initiation d'une suspension et évolution au fil du temps : (A) (B) initiation de la suspension ; évolution de la suspension (C) après 7 jours de culture, (D) suspension diluée au demi après 17 jours et (E) dilution au demi et division en 2 erlenmeyers de la suspension. ....	144
Figure III-13 – Photos des suspensions cellulaires d'IGR cultivées dans un milieu ANA/BAP (1,5 mg/mL/0,5 mg/mL) permettant leur multiplication .....	144
Figure III-14 – Comparaison des suspensions au moment de la mise en culture à la lumière et à l'obscurité (J0) et après 18 jours de culture (J18). Le trait orange pointillé représente le volume occupé par les cellules dans la suspension. (1) (2) : suspensions cultivées à la lumière, (A) (B) : suspensions placées à l'obscurité. ....	145
Figure III-15 – Courbe de croissance des suspensions d'IGR sur un milieu ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L) (A) masse fraîche, (B) masse sèche. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- l'écart type de trois réplicats. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les valeurs obtenues selon le test de Tukey à $\alpha = 0,05$ . ....	146
Figure III-16 – Régénération d'une plantule entière (D) à partir d'un explant caulinaire (A) grâce à une culture sur milieu sans hormone (B) puis un repiquage sur milieu contenant de l'IBA (C). ....	147
Figure III-17 – Multiplication à partir d'explants caulinaires de pousses d'IGR. ....	148
Figure III-18 – Extraits heptane (1) et acétate d'éthyle (2) de racines, tiges et feuilles d'IGR avant évaporation du solvant d'extraction. ....	149
Figure III-19 – Longueur de la racicule des graines de cresson en présence d'extraits d'IGR à 20 mg/mL, de lawsonie et de solvants de resububilisation (i-PrOH). CG : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la longueur des radicules des graines de 3 plaques (12 graines par conditions et par plaque) $\pm$ erreur type de la moyenne. ....	153
Figure III-20 – Longueur de la racicule des graines de cresson en présence d'extraits d'IGR à 5 mg/mL, de lawsonie et de solvants de resububilisation (i-PrOH et EtOH) CG : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la longueur des radicules des graines de 3 plaques (12 graines par conditions et par plaque) $\pm$ erreur type de la moyenne. ....	154
Figure III-21 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des extraits éthanoliques de feuilles, fleurs, racines, tiges et suspensions cellulaires d'IGR par HPLC-DAD (gradient 1), (1) : lawsonie, (2) : 2-MNQ. ....	155
Figure III-22 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) de la lawsonie et de la 2-MNQ par HPLC-DAD (gradient 1), encadré spectre d'absorbance UV .....	156
Figure III-23 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR à 20 mg/mL, par HPLC – DAD (gradient 1). En vert la période sur laquelle les fractions ont été collectées. Les traits verticaux indiquent les limites de collecte entre les fractions. ....	158

## Listes des figures

Figure III-24 – Nombre de graines germées par microfraction d'un extrait éthanolique de feuilles d'IGR, avec 4 graines par microfractions sauf pour la fraction 1+2 pour laquelle 6 graines ont été testées. ....	159
Figure III-25 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des différentes microfractions obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique d'IGR, par HPLC – DAD (gradient 1). En orange les fractions 16 et 17 et en bleu les fractions 14, 22, 27, 28, 30 et 37. ....	159
Figure III-26 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des microfractions 16 et 17 par HPLC-DAD (gradient 1). ....	160
Figure III-27 – Profil de fragmentation de l'hyperoside (A) et de l'isoquercétine (B) obtenu par HPLC-HRMS en mode d'ionisation positif. ....	160
Figure III-28 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des microfractions 10, 11,12,13 et 14, par HPLC-DAD (gradient 1).....	162
Figure III-29 – Formes tautomères de la lawsone (López López <i>et al.</i> , 2014).....	162
Figure III-30 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la microfraction 22 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV du composé majoritaire. ....	163
Figure III-31 – Profil de fragmentation du kaempférol-3-O-glucoside obtenu par HPLC – HRMS en mode positif. ....	164
Figure III-32 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des microfractions 26, 27 et 28 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV des composés 1, 2 et 3.....	165
Figure III-33 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la microfraction 30 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV du composé majoritaire ....	165
Figure III-34 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la microfraction 37 avec le gradient 1 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV du pic majoritaire.....	166
Figure III-35 – Schémas de fragmentation proposés de l'impatiérol.....	167
Figure III-36 – Étapes d'optimisation du gradient utilisé en HPLC analytique pour le fractionnement par HPLC préparative.....	168
Figure III-37 – Chromatogramme (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR analysé par HPLC-DAD, avec le gradient 1 (colonne nucléodur C18 150 x 3,0 mm, 3,0 µm), le gradient 2 et le gradient 3 (colonne Kinetex C18 de dimensions 100 x 21,20 mm, 5 µm).....	169
Figure III-38 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR par HPLC préparative-UV (gradient 4).....	170
Figure III-39 – Test antigerminatif des 20 fractions de l'extrait de feuilles d'IGR collectées après HPLC – préparative. Lignes B-F : test des fractions (3 graines par fractions réalisé en duplicat). A : témoin négatif solvant (éthanol), G : témoin positif (lawsone à 0,083 mg/mL), H : témoin de germination. Encadrés verts : zones d'inhibition de la germination. ....	170
Figure III-40 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des fractions obtenues avec l'HPLC préparative, (1) lawsone, (2) 2-MNQ par HPLC – DAD (gradient 1).....	171
Figure III-41 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait d'IGR par HPLC-DAD avec en bleu les zones actives détectées grâce à l'HPLC préparative et en violet celles mises en évidence grâce au microfractionnement .....	173
Figure IV-1 – Localisation des lieux de récolte des plantes étudiées en France, dans le Bas Rhin au Sud de Strasbourg. ....	177
Figure IV-2 – Plant de fraisier des Indes.....	179
Figure IV-3 – Plant de benoite commune (Laurent Petit, Tela Botanica).....	180
Figure IV-4 – Plant de pourpier commun (Jean-Claude Echardour, Tela botanica).....	181
Figure IV-5 – Plant de potentille (Mathieu Sinet Tela Botanica).....	182

## Listes des figures

Figure IV-6 – Plant de gaillet commun (à gauche), (Julien Barataud, Tela botanica) et de gaillet gratteron (à droite), (Paul Fabre, Tela botanica).....	183
Figure IV-7 – Schéma de la méthode utilisée par Oster <i>et al.</i> (1990) pour déterminer l'influence des molécules volatiles contenues dans les morceaux de feuilles de thuya sur la germination des graines de cresson.....	184
Figure IV-8 - Longueur de la radicule des graines de cresson en présence d'extraits des différentes plantes testées à 20 mg/mL, de lawsonie et de solvants de resolubilisation (i-PrOH/H <sub>2</sub> O : 50/50 (v/v)). Témoin- : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la longueur des radicules des graines de 3 plaques (12 graines par condition) ± erreur type de la moyenne. * valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et identiques à celles de la lawsonie selon un test de Tukey $\alpha = 0,05$ , **. Valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et de la lawsonie selon un test de Tukey $\alpha = 0,05$ . .....	189
Figure IV-9 – Longueur de la radicule des graines de cresson en présence d'extraits des différentes plantes testés à 5 mg/mL, de lawsonie et de solvants de resolubilisation (EtOH (T)). Témoin- : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne des longueurs des radicules des graines de 3 plaques (12 graines par conditions) ± erreur type de la moyenne * valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et identiques à celles de la lawsonie selon un test de Tukey $\alpha = 0,05$ , **. Valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et de la lawsonie selon un test de Tukey $\alpha = 0,05$ .....	190
Figure IV-10 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait à l'acétate d'éthyle de potentille par HPLC-DAD (gradient 1).....	191
Figure IV-11 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique et éthanol/eau (60/40, v/v) du thuya par HPLC-DAD (gradient 1).....	192
Figure IV-12 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la fraction active du thuya par HPLC-DAD (gradient 1).192	
Figure VI-1 – Protocole des tests antigéminatifs permettant de faire varier le volume de resolubilisation en conservant la même masse de standards. ....	207
Figure VI-2 – Mesure de la taille des radicules des graines de cresson dans les plaques 96 puits.....	208
Figure VI-3 – Protocole d'extraction utilisé pour l'extraction des échantillons de plantes.....	209
Figure VI-4 – Protocole de préparation des extraits avant d'effectuer les tests d'activité. Extraits à l'heptane (H), à l'acétate d'éthyle (Ac), à l'isopropanol/eau : 50/50 (v/v) (I), éthanolique (E), à l'éthanol/eau 60/40 (v/v) (E/H), aqueux (Aq). ....	210
Figure VI-5 – Protocole du test optimisé et validé utilisé pour l'étude du potentiel phytotoxique des extraits de plantes. ....	210
Figure VI-6 – Protocole de stérilisation des graines d'IGR dans des boîtes Magenta stériles .....	215
Figure VI-7 – Mise en culture des graines d'IGR après le protocole de stérilisation 1 .....	216
Figure VI-8 – Protocole de stérilisation 2 des graines d'IGR dans des boîtes Magenta stériles .....	216
Figure VI-9 – Protocole de stérilisation des explants foliaires pour la mise en culture dans le but d'obtenir des cals. ....	217
Figure VI-10 – Protocole de stérilisation des explants caulinaires des plantules récoltées pour régénérer des plantules d'IGR. ....	220
Figure VII-1 – Schéma d'une cellule végétale .....	223
Figure VII-2 – Schéma d'une feuille .....	225
Figure -VII-3 – Schéma d'une tige avec des feuilles verticillées.....	226

## Listes des figures





---

# LISTE DES TABLEAUX

---



## Liste des tableaux

Tableau I-1 – Caractéristiques des plantes monocotylédones et dicotylédones .....	43
Tableau I-2 – Mécanismes de résistance mis en place en fonction de l'étape d'action de l'herbicide. Adapté de Délye <i>et al.</i> (2013) .....	57
Tableau I-3 – Liste non exhaustive des conditions expérimentales de tests en boîte sur papier filtre décrites dans la littérature pour mesurer l'activité phytotoxique de diverses plantes ou métaux sur des plantes cibles variées. (EE : Extrait éthanolique, EA : extrait aqueux, HE : huile essentielle, EM : extraits méthanoliques, MP : molécules pures, EC Extrait chloroforme, EMH : extrait méthanol/eau, EEH : extrait éthanol/eau, M : métaux, EH : extrait hexane, EDM : extrait dichlorométhane/ eau), nd : non déterminé .En vert, l'étude utilisant des boîtes de Petri de 3,5 cm et en jaune l'étude utilisant des plaques 24 puits.....	68
Tableau II-1 – Exemple du nombre de graines germées en conditions contrôlées avec l'utilisation de 2 boîtes différentes par jour. La manipulation a été réalisée trois jours différents avec 10 graines par condition.....	86
Tableau II-2 – Taux de germination moyens des graines de cresson en fonction du volume d'eau dans les puits après 48 h d'incubation (8 graines par conditions 3 réplicats). .....	92
Tableau II-3 – Coefficients de variabilité de répétabilité $CV_r$ et de fidélité intermédiaire $CV_{IF}$ en fonction de la méthode et de la concentration de lawsone utilisée.....	103
Tableau II-4 – Taux de germination (%) des graines de cresson exprimé comme la moyenne (erreur type de la moyenne) des 3 réplicats en fonction de la concentration en extrait éthanolique d'IGR et du type de test utilisé et $CV_r$ en %. .....	107
Tableau III-1 – Liste non exhaustive des molécules décrites dans les différentes parties de l'IGR (en gris les acides phénoliques, en orange les naphthoquinones ou dérivés du naphthalène, en bleu les flavonoïdes et en vert les flavonoïdes glycosylés).....	129
Tableau III-2 – Bilan des différents protocoles de stérilisation testés à partir des graines germées (GG) et des plantules (P). .....	137
Tableau III-3 – Bilan du pourcentage de contamination après 7 jours de culture pour chaque milieu et chaque répétition .....	141
Tableau III-4 – Nombre de cals total développés après 2 mois de mise en culture pour chaque milieu testé.....	141
Tableau III-5 – Rendements d'extraction (% , m/m) en fonction des solvants utilisés et de la matrice étudiée. .	149
Tableau III-6 – Taux de germination moyen (erreur type de la moyenne) des graines de cresson en fonction des extraits obtenus par les différents solvants pour les 4 organes de l'IGR, testés à 20 mg/mL, 12 graines par plaque 96 puits, 3 plaques par condition. (En vert les extraits ayant une activité comparable à celle de la lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination pour un organe donné selon le test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ . .....	151
Tableau III-7 – Taux de germination moyen (erreur type de la moyenne) des graines de cresson en fonction des extraits de différentes polarités des organes d'IGR testés à 5 mg/mL. 12 graines par plaques 96 puits, 3 plaques par condition. (En vert les extraits ayant une activité comparable à celle de la lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ . .....	152
Tableau III-8 – Concentration de la lawsone et de la 2-MNQ dans les extraits éthanoliques des différentes parties de l'IGR (injection de 5 $\mu$ L à 5 mg/mL) .....	157
Tableau III-9 – Ions fragments obtenus lors de la fragmentation du composé majoritaire de la microfraction .....	167
Tableau III-10 – Rendement des fractions collectées après l'HPLC préparative (40 mg injectés).....	170

## Liste des tableaux

Tableau III-11 – Nombre de graines germées pour chaque fraction collectée par HPLC préparative. Trois graines par plaque, en duplicat. ....	171
Tableau III-12 – Composés identifiés dans les fractions actives de l'extrait éthanolique d'IGR par HPLC Préparative (HP) ou grâce au microfractionnement (MF), * identifié grâce à un standard. ....	173
Tableau IV-1 – Liste des plantes récoltées et du lieu de la collecte .....	178
Tableau IV-2 – Rendements d'extraction (% , m/m) en fonction des solvants utilisés et de la plante extraite. * seuls 2 cycles d'extraction ont été effectués .....	186
Tableau IV-3 – Taux de germination moyens (erreur type de la moyenne) des graines de cresson mesurés pour les extraits des 7 plantes obtenus par les différents solvants d'extraction, testés à 20 mg/mL. 12 graines par plaque 96 puits, 3 plaques par condition (en vert foncé les extraits ayant une activité comparable à celle de la lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test et en vert clair les extraits ayant une activité intermédiaire, en blanc les extraits ayant une activité différente de celle de la lawsone). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination pour une plante donnée selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ .....	187
Tableau IV-4 – Taux de germination moyens (erreur type de la moyenne) des graines de cresson mesurés pour les extraits des 7 plantes obtenus par les différents solvants d'extraction, testés à 5 mg/mL. 12 graines par plaque 96 puits, 3 plaques par condition (en vert les extraits ayant une activité comparable à celle de la lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test, en blanc les extraits ayant une activité différente de celle de la lawsone). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination pour une plante donnée selon un test de Tukey au seuil $\alpha = 0,05$ . ....	187
Tableau V-1 – Activité des différents extraits de plantes testés sur les graines de cresson (en vert foncé les extraits présentant une activité similaire à la lawsone lors de l'utilisation d'un extrait à 5 mg/mL, en vert intermédiaire, les extraits présentant une activité intermédiaire lors de l'utilisation d'un extrait à 5 mg/mL et en vert clair, les extraits présentant une activité similaire à l'activité de la lawsone lors de l'utilisation d'un extrait à 20 mg/mL. Les cases grisées correspondent à des extraits non traités.....	201
Tableau VI-1 – Provenance des étalons, solvants, réactifs et appareils utilisés pour la mise au point du test en plaque 96 puits .....	205
Tableau VI-2 – Conditions de germination des différentes graines cibles. ....	208
Tableau VI-3 – Gradient utilisé pour l'analyse des extraits et des molécules pures utilisant l'HPLC analytique	211
Tableau VI-4 – Gradients utilisés pour la transposition entre HPLC analytique et HPLC préparative.....	212
Tableau VI-5 – Paramètres utilisés pour les analyses en spectrométrie de masse .....	213
Tableau VI-6 – Provenance des constituants des milieux de culture et des appareils utilisés pour la culture <i>in vitro</i> .....	214

---

INTRODUCTION  
GENERALE

---



## Introduction générale

---

Ces dernières décennies, l'usage des produits phytopharmaceutiques a augmenté pour permettre une hausse des rendements agricoles en lien avec l'augmentation de la population mondiale. Cet usage excessif a eu des conséquences néfastes sur l'environnement avec notamment une atteinte des espèces non ciblées comme les espèces aquatiques, les Humains mais également une pollution des nappes phréatiques. De plus en plus de composés herbicides sont retirés du marché au fur et à mesure que les études évaluent leur toxicité. Néanmoins, pour conserver des rendements de culture acceptables, des alternatives sont nécessaires. Ainsi, des initiatives se développent dans différents pays pour promouvoir des produits plus respectueux de l'environnement comme les produits de biocontrôle.

Cette thèse s'inscrit dans ce contexte de recherche d'alternatives en étudiant les plantes invasives ou adventices de la Région Grand Est. En effet, ces plantes ont des capacités de prolifération accrues leur permettant de coloniser un maximum de territoire. Pour cela, elles possèdent diverses stratégies dont une, pouvant se baser sur le relargage dans l'environnement de composés phytotoxiques ralentissant la croissance des plantes alentours. Ce mécanisme de production de métabolites influençant les autres plantes est appelé l'allélopathie et les interactions en résultant peuvent être positives ou négatives sur les espèces cibles.

L'objectif majeur de ce projet de thèse était donc d'identifier des molécules phytotoxiques produites dans les plantes invasives, adventices ou ornementales vigoureuses de la Région Grand Est. Pour ce faire, différents objectifs ont été définis :

- Le développement d'une nouvelle méthode de tests de mesure de l'activité bioherbicide permettant un gain de temps et un couplage séparation chromatographique – test biologique.
- L'étude du potentiel phytotoxique de la balsamine de l'Himalaya, plante invasive en Alsace et identification des molécules actives de cette plante
- La culture *in vitro* de la balsamine de l'Himalaya avec l'obtention de cultures de cellules indifférenciées (cals, suspensions) et également de plantules.
- Le criblage de l'activité phytotoxique d'une vingtaine de plantes et l'identification des composés actifs.

Ce manuscrit est divisé en 7 chapitres. Le premier chapitre porte sur l'étude bibliographique des plantes adventices, de leur impact sur les cultures mais également sur les moyens de les contrôler notamment en utilisant des produits phytosanitaires ou des alternatives plus respectueuses de l'environnement. Les techniques d'analyse et de production de composés



## Introduction générale

d'intérêt par les plantes (comme la culture *in vitro*) sont également évoqués. Le deuxième chapitre se concentre sur le développement de la méthode de test de mesure de l'activité bioherbicide en plaque 96 puits et du couplage entre la chromatographie liquide et le test biologique. Le troisième chapitre porte sur l'étude du potentiel phytotoxique de la plante modèle du projet, la balsamine de l'Himalaya en utilisant la nouvelle méthode développée. Le quatrième chapitre se concentre sur les résultats du criblage de plusieurs plantes invasives ou adventices de la région. Le cinquième chapitre comporte les conclusions générales du manuscrit, une courte discussion et des perspectives pour la suite du projet. Les chapitres 6 et 7 composent le glossaire et le matériel et méthodes.

---

# CHAPITRE I

---



## Chapitre I - Introduction

### 1. Les herbicides : contexte, utilisation, avantages et problématiques :

#### 1.1 Contexte : la lutte contre les plantes adventices :

##### 1.1.1 Généralités sur les plantes adventices :

Selon la définition de Navas 1991, une plante adventice ou une « mauvaise herbe » est une plante qui forme des populations capables de se développer dans des habitats cultivés, considérablement perturbés ou occupés par l’Homme et qui peut potentiellement faire baisser ou déplacer la population de plantes qui ont été délibérément cultivées ou qui ont un intérêt écologique ou esthétique (Zimdahl, 2018).

Les plantes adventices peuvent donc se développer dans des environnements aquatiques ou terrestres. Les adventices aquatiques sont retrouvées partout dans le monde et peuvent être flottantes (jacinthe d’eau : *Eichhornia crassipes* L.) submergées (myriophylle en épi : *Myriophyllum spicatum* L.) ou émergées (massettes *Typha* sp.) en fonction des espèces concernées (M. Kaur *et al.*, 2018) . Les algues ne sont quant à elles pas vraiment considérées comme des mauvaises herbes ou des adventices mais restent une catégorie végétale à surveiller avec des préoccupations qui ont commencé dès les années 1950 (Bartsch, 1954). Les plantes adventices terrestres et en particulier les adventices des cultures sont en grande majorité des Angiospermes<sup>1</sup> (plantes à fleurs) sauf pour les prêles qui sont dépourvues de véritables fleurs, d’étamines et de graines et qui appartiennent aux Ptérédophytes (INRAE, 2022). Parmi les angiospermes, on distingue deux groupes : les monocotylédones et les dicotylédones. Les différences entre ces 2 groupes sont résumées dans le **tableau I-1** avec pour chaque catégorie des exemples de plantes adventices et cultivées. Il sera fait référence à certaines de ces 2 catégories de plantes plus loin dans le manuscrit indépendamment du fait qu’elles soient considérées comme adventices.

**Tableau I-1 – Caractéristiques des plantes monocotylédones et dicotylédones**

	Monocotylédones	Dicotylédones
Cotylédons	1	2
Fleurs	Pièces florales par 3	Pièces florales par 4 ou 5
Feuilles	Nervures parallèles	Nervures en réseau
Pollen	Un pore	Trois pores (souvent)
Racines	Racines adventives	Racine principale persistante
Exemples d’adventices	Panic pied de coq ( <i>Echinochloa crus-galli</i> ) Digitaire sanguine ( <i>Digitaria sanguinalis</i> )	Chénopode blanc ( <i>Chenopodium album</i> ) Gaillet gratteron ( <i>Galium aparine</i> )
Exemples de plantes cultivées	Blé tendre ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	Radis ( <i>Raphanus sativus</i> L.)

<sup>1</sup> Les termes indiqués en bleu soulignés sont définis dans le glossaire

Ces plantes adventices prolifèrent rapidement grâce à diverses stratégies évolutives et leur reproduction peut se faire de façon végétative ou par graine. Un grand nombre de graines sont produites et elles disposent d'un mécanisme de dispersion efficace les propageant sur de grandes distances. Après la germination, les plantes grandissent rapidement, avec un stade végétatif court qui leur permet de se reproduire très rapidement.

### **1.1.2 Utilité des plantes adventices :**

On appelle plantes messicoles les plantes adventices ayant un cycle de développement synchrone à celui des plantes cultivées. Ces plantes ont des avantages que ce soit pour les insectes, les oiseaux ou les herbivores. En effet, l'enherbement spontané favorise la diversité des insectes présents dans les cultures mais permet aussi de contrôler les populations de ravageurs. Par exemple la mise en place du plan Biodivleg faisant partie du plan EcoPhyto (décrit dans la partie 2 de ce chapitre) consiste à aménager les bords des parcelles et permet la maîtrise de la mouche des cultures. Les plantes messicoles sont aussi un réservoir nutritif pour les oiseaux, qui peuvent se nourrir de leurs graines mais aussi des insectes présents sur ces plantes. De plus, cultiver ces plantes peut être associé avec une gestion globale de l'agriculture pour la production de fourrage pour les herbivores (Cambecèdes *et al.*, 2012). Enfin, ces plantes considérées comme nuisibles peuvent être consommées par l'Homme, comme le pourpier (*Portulaca oleracea* L.) ou l'ortie (*Urtica dioica* L.). Certaines études ou plans proposent même une conservation de ces plantes voir une culture à des fins alimentaires en contrôlant ainsi la qualité de la production (Ceccanti *et al.*, 2018).

### **1.1.3 Désagréments causés par les plantes adventices :**

Malgré certaines utilisations des plantes adventices, leur capacité de prolifération accrue pose divers problèmes. La compétition pour les ressources avec les autres plantes présentes provoque une perte de rendement au sein des cultures pouvant aller jusqu'à 100%. De manière générale, la perte attribuée aux mauvaises herbes aux États-Unis dans les années 1970 pour les cultures des céréales était d'environ 10% (Zimdahl, 2018). En plus de la perte de rendement, les plantes adventices induisent des coûts supplémentaires. Pouvant être hôtes de certains ravageurs (virus, insectes, nématodes, champignons), elles rendent plus difficile la protection des cultures comme par exemple, l'avoine sauvage qui peut être l'hôte de la pourriture blanche (oïdium) qui infeste les cultures d'avoine, de blé ou d'orge (Zimdahl, 2018). Les graines de plantes adventices vont aussi être ramassées avec les plantes cultivées et réduire la qualité de la récolte si elles ne sont pas enlevées ce qui provoque un surcoût de production. Il est donc nécessaire de contrôler leur présence pour des questions de sécurité alimentaire.

De plus, si ces plantes adventices deviennent invasives ou envahissantes, elles peuvent provoquer une perte de biodiversité dans les écosystèmes car elles peuvent empêcher les autres plantes d'avoir accès aux ressources et de se développer. Ces mauvaises herbes peuvent être dangereuses pour les animaux si elles sont présentes dans les fourrages avec des risques d'intoxication, ou de blessure mais également pour les humains avec des risques d'allergie, de départ de feu ou de perte de visibilité sur la route (Zimdahl, 2018).

## **1.2 Utilisation des herbicides :**

### **1.2.1 Historique et mise en place :**

Afin de contrôler le développement de ces mauvaises herbes et de limiter leur impact sur les rendements des cultures, des herbicides ont commencé à être utilisés à partir des années 1870. Ils étaient à l'époque, inorganiques, avec un spectre d'action large et les mécanismes d'action étaient alors inconnus.

A partir des années 1940, la découverte de nouveaux herbicides grâce à de vastes essais a commencé en utilisant des plantes modèles et en pulvérisant les composés actifs sur les plants ou en les ajoutant directement dans le milieu nutritif. L'effet du composé était visualisé grâce aux symptômes que développait la plante, ainsi qu'à son poids sec et frais (Kraehmer *et al.*, 2014). Les modes d'action n'étaient pas très diversifiés ni vraiment étudiés. Les premiers herbicides commercialisés sont les auxines, les herbicides perturbant [l'organisation microtubulaire](#) et les [photosystèmes](#) en particulier le photosystème II.

A partir des années 1980, des essais biochimiques ont été menés pour déterminer plus précisément les modes d'actions des herbicides et leurs cibles biologiques avec notamment la caractérisation des sites de liaison de ces composés. Les enzymes spécifiques des plantes ont donc été privilégiées pour éviter la toxicité sur les mammifères (Kraehmer *et al.*, 2014).

Depuis les années 1990 on peut constater une augmentation de la quantité d'herbicides utilisée dans le monde, passant de 900 000 tonnes utilisées en 1990 à plus de 2 millions en 2019 (FAO, 2022). Les continents qui en sont les plus gros consommateurs sont l'Asie (50%), l'Amérique (36.4%), l'Europe (11%), l'Océanie (1.8%) et enfin l'Afrique avec une part de 1,3%. Même si la France se classe 8<sup>ème</sup> des pays les plus consommateurs d'herbicides sur la moyenne entre 1990 et 2009 avec environ 30 000 tonnes, elle reste loin derrière la Chine avec une moyenne de 680 000 tonnes. De plus, en France, depuis 1990 le tonnage utilisé par an n'a pas vraiment augmenté (37 000 tonnes utilisées en 1990 contre 34 000 tonnes en 2019 avec une baisse sous les 30 000 tonnes de 2002 à 2013) (FAO, 2022).

Les herbicides utilisés dans le monde sont des molécules diverses avec des modes d'action spécifiques, ils peuvent être classés selon plusieurs critères qui sont détaillés dans les paragraphes suivants à savoir : leur moment et méthode d'application (quand sont-ils appliqués

et comment ?), leur mode d'action (comment inhibent-ils la croissance des plantes ?) et leur sélectivité (quelles plantes inhibent –ils ?).

### **1.2.2 Moment et méthode d'application des herbicides :**

Les herbicides peuvent être appliqués à différents moments du développement de la plantule (**figure I-1**). En effet, le passage de graine à plantule se fait en différentes phases. La phase I est celle de l'imbibition (entrée d'eau dans la graine sèche). C'est pendant cette phase que la graine se remet à fonctionner (reprise de la respiration cellulaire, synthèse des ARNs). La phase II est celle de la germination avec une teneur en eau stable dans la graine et la synthèse des protéines. La durée de cette phase est variable en fonction de la durée de la dormance de la graine. La phase III débute avec l'émergence de la radicule et est caractérisée par une croissance rapide et l'apparition des parties aériennes : la plantule est formée.

Les herbicides peuvent être appliqués en pré-semis, en pré-émergence ou en post-émergence (**figure I-1**). Leur moment d'action détermine également la méthode d'application, mais aussi leur sélectivité. En effet les herbicides de pré-semis et de pré-émergence vont être mis directement dans le sol avant la germination de la graine. Comme les herbicides de pré-semis ou de pré-émergence doivent être présents avant la germination de la graine, ils sont incorporés dans le sol grâce à divers systèmes : comprimés à libération lente, micro-encapsulation (micro ou nanoparticules). Les comprimés sont faits en un matériau inerte sur lequel est déposé l'herbicide. Une fois mouillés ils vont relarguer les composés herbicides petit à petit. Ces comprimés sont utilisés pour l'application du piclorame par exemple. Cette méthode permet d'utiliser une concentration en herbicide plus faible que les méthodes utilisant des granulés ou des sprays. La micro ou nano encapsulation est l'action d'intégrer les molécules actives dans un vecteur de transport biodégradable et peu cher qui peut être constitué de polymères, d'amidon ou d'alginate de calcium par exemple. Cette technique permet de réduire la quantité d'herbicides nécessaire, mais également d'augmenter leur stabilité (Shahena *et al.*, 2020).

Les herbicides de post-émergence sont quant à eux appliqués une fois que la pousse est sortie de terre, avec une application foliaire. Ils peuvent être sélectifs d'une catégorie de plante ou non et sont plutôt utilisés sous forme de granulés à diluer dans l'eau ou de solutions à appliquer directement sur les parties foliaires comme le glyphosate et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (Shahena *et al.*, 2020).

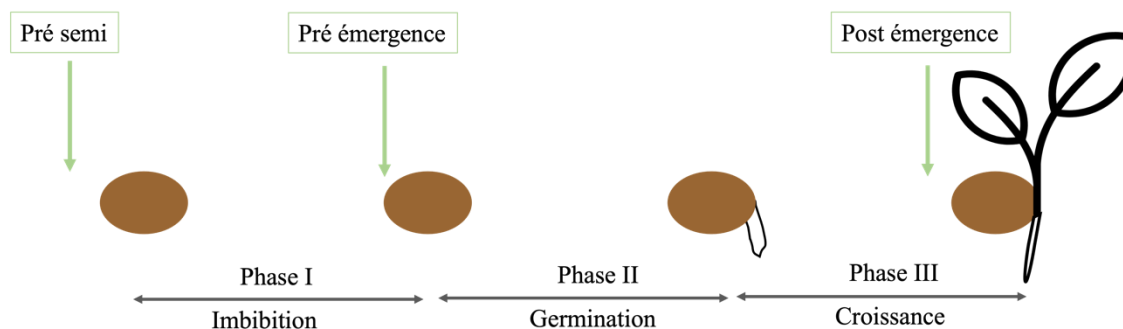


Figure I-1 – Différentes étapes de la germination d’une graine

### 1.2.3 Les modes d’action des herbicides :

Les modes d’action des molécules herbicides sont variés et peuvent affecter différentes voies de signalisation empêchant ainsi la survie de la plante. Pour déterminer le mode d’action d’un composé, des critères morphologiques peuvent être utilisés comme la croissance des racines ou de l’hypocotyle, mais ces observations peuvent être insuffisantes. Des techniques différentes permettent de compléter les premières observations morphologiques comme la vérification de l’index mitotique pour évaluer la division des cellules, la perte d’intégrité membranaire qui peut mettre en évidence une déstructuration des membranes, la mesure de la chlorophylle ou d’autres pigments qui indiquent une inhibition de la photosynthèse (Dayan et al., 2000).

Le Comité d’Action de la Résistance aux Herbicides (HRAC) est un groupement formé par des acteurs de l’industrie agrochimique, avec comme membres les entreprises BASF, Bayer ou encore Syngenta dans le but de lutter contre la résistance des plantes adventices. Ce comité a recensé 263 herbicides et a établi une classification des modes d’action (actualisée en 2021) de ces derniers en fonction de la cible métabolique qu’ils inhibent<sup>2</sup>. Trois grandes catégories ont été formées : les herbicides ciblant **l’activation des espèces réactives de l’oxygène par la lumière (1)** au nombre de 86, ceux qui impactent **le métabolisme cellulaire (2)** au nombre de 120 et ceux qui impactent **la division cellulaire (3)** au nombre de 41 (**figure I-2**). Ces 3 grandes catégories sont divisées en 26 sous-catégories numérotées de 1 à 34 selon la fonction biologique que les herbicides inhibent, la dernière sous-catégorie étant celle contenant les herbicides dont le mode d’action est inconnu. Quelques modes d’action des herbicides sur ces 3 grandes cibles sont détaillés dans les paragraphes suivants.

<sup>2</sup> Classification des modes d’action des herbicides de l’HRAC disponible en Annexe 1



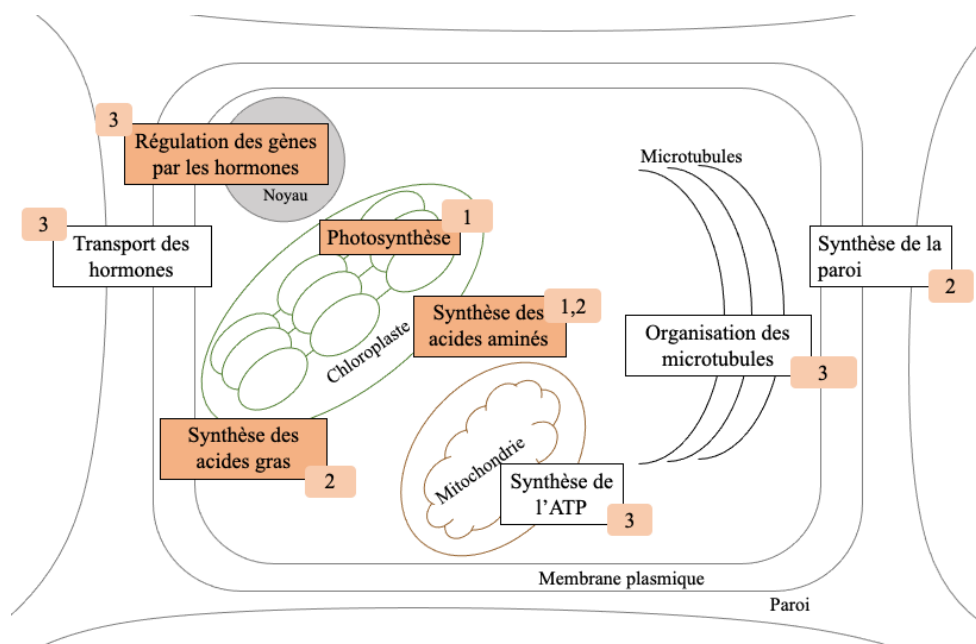


Figure I-2 – Cibles biologiques des herbicides décrits par le comité d'Action de la Résistance aux Herbicides avec en orange les cibles qui seront présentées dans ce manuscrit. Les chiffres en orange correspondent aux différentes catégories de cibles que les herbicides inhibent. Adapté de Délye *et al.* (2013)

### 1.2.3.1 Impact sur l'activation des espèces réactives de l'oxygène par la lumière :

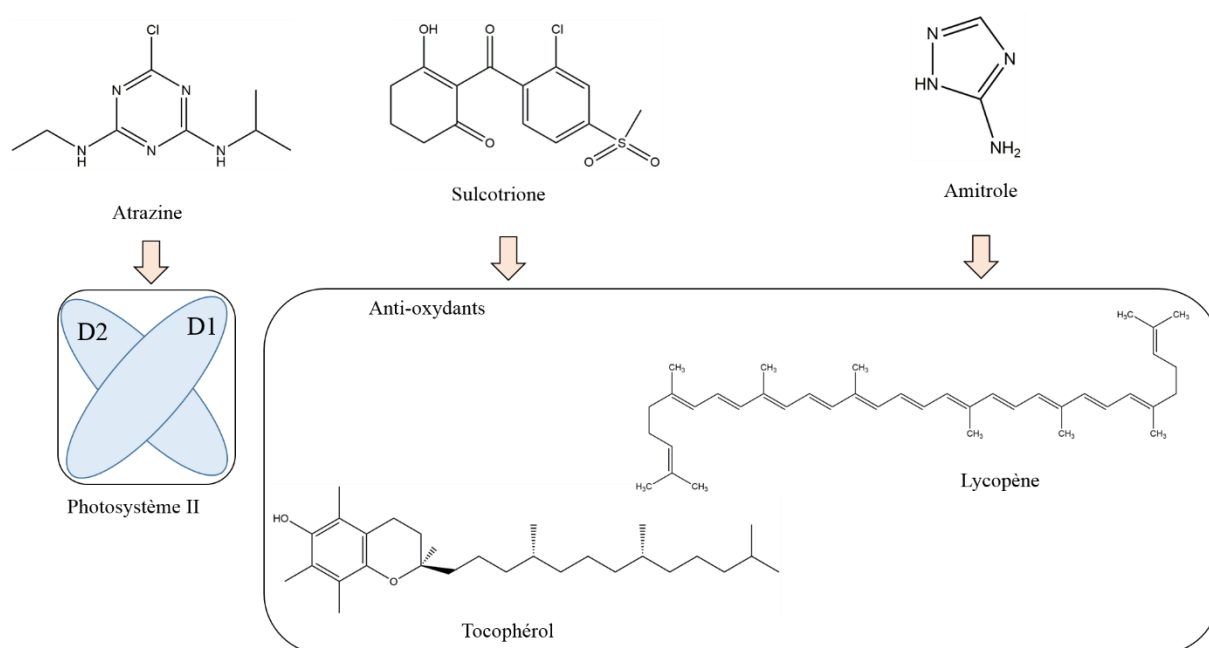
Le premier grand mécanisme d'action des herbicides décrits par l'HRAC est l'activation des espèces réactives de l'oxygène par la lumière et impactent donc la photosynthèse de façon plus ou moins directe. Cette catégorie contient 11 sous-catégories en fonction de la cible métabolique inhibée.

Les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS en anglais) sont produites par le mécanisme cellulaire, de façon physiologique notamment par la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie, le [chloroplaste](#) et le [peroxysome](#). En revanche, leur présence peut être augmentée lorsque la plante subit divers stress (sécheresse, salinité ou exposition à la lumière). Les 2 principaux ROS sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) formé à partir d' $O_2$  et peu réactif et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  formé par la photorespiration, ou par la chaîne de transport des électrons du chloroplaste, de la mitochondrie. Ces 2 molécules peuvent être converties en des espèces plus réactives comme l' $\bullet OH$ , qui interagit avec les molécules biologiques comme les lipides, les protéines et peut entraîner une mort cellulaire (Sharma *et al.*, 2012). Les plantes ont donc développé des systèmes leur permettant de réduire ce stress oxydant qui sont des enzymes ou des molécules antioxydantes comme le tocophérol, ou l'acide ascorbique par exemple. Ces systèmes sont pris pour cible par les herbicides de cette catégorie.

La première cible de ces herbicides est la protéine D1 qui est importante pour le fonctionnement du photosystème II. Les plantes sont capables d'utiliser l'énergie lumineuse pour former des molécules carbonées mais également de stocker cette énergie sous forme d'ATP et de  $NADPH_2$ . Cette conversion est possible grâce à plusieurs complexes

photosynthétiques appelés photosystèmes qui sont localisés dans la membrane des chloroplastes. Le photosystème II est le système qui va capter la lumière, il possède un centre actif composé de plusieurs protéines, dont les plastoquinones, qui peuvent accepter des électrons. Ces plastoquinones se lient normalement à une protéine D1 située dans le photosystème II. Certains herbicides comme **l'atrazine** de la famille des triazines se lient sur le site de la protéine D1 qui permet la fixation des plastoquinones empêchant leur interaction. Les électrons ne pouvant plus être évacués, la production d'espèces réactives de l'oxygène est accrue (Heap, 2022). Les herbicides ayant ce mode d'action sont au nombre de 35 selon la classification de HRAC.

Certains herbicides inhibent également les molécules antioxydantes comme le tocophérol ou le lycopène. Le tocophérol empêche l'oxydation des lipides et réagit avec l'O<sub>2</sub> produit dans les chloroplastes protégeant ainsi les membranes et le photosystème II. La voie de biosynthèse de cette molécule implique 2 composés : l'acide homogentisique et le phytyldiphosphate et nécessite 5 enzymes dont **l'hydroxyphényl pyruvate dioxygénase** (Sharma *et al.*, 2012). Cette enzyme est la cible des herbicides appartenant à la sous-catégorie 27 telle que la **sulcotrione** (trikétone). Le lycopène fait partie des caroténoïdes et sa synthèse implique deux enzymes : la **phytoène désaturase** et de la **lycopène cyclase** (Sharma *et al.*, 2012). Ces enzymes sont les cibles des herbicides des sous catégories 12 et 34 (dont l'amitrole est le seul représentant) (**figure I-3**).



**Figure I-3 – Structure chimique de l'atrazine (sous-catégorie 5), de la sulcotrione (sous-catégorie 27) et de l'amitrole (sous-catégorie 34) inhibant le fonctionnement du photosystème II et la synthèse des composés anti-oxydants : le tocophérol et le lycopène**

### 1.2.3.2 Impact sur le métabolisme cellulaire :

Le métabolisme cellulaire est une cible de choix pour les herbicides car en empêchant la cellule de produire les molécules dont elle a besoin c'est toute la plante qui va s'affaiblir voire mourir. Parmi ces molécules essentielles à la vie de la plante on peut trouver les acides gras constituant les parois, les membranes et les cires (Dayan, 2019), mais aussi les acides aminés qui permettent la synthèse des protéines et des métabolites spécialisés qui aident la plante à s'adapter à son environnement.

Dans cette catégorie d'inhibiteurs, 9 groupes ont été constitués selon la classification de l'HRAC en fonction de leur mécanisme d'action. Les mécanismes des inhibiteurs de la synthèse de certains acides aminés et des acides gras sont décrits dans les paragraphes suivants.

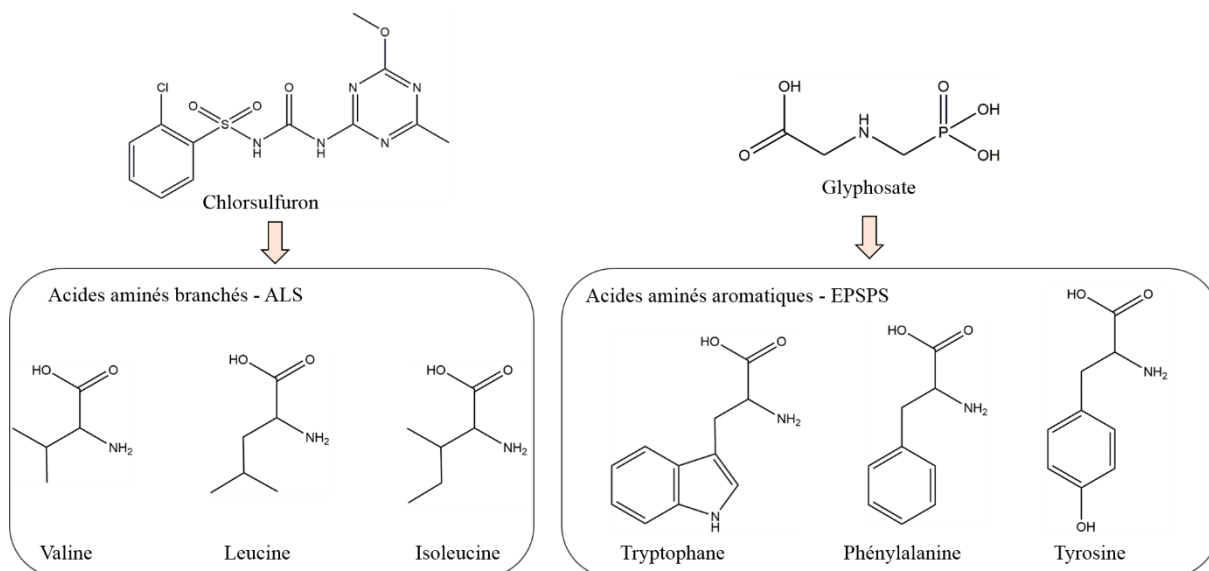
#### 1.2.3.2.1 Herbicides ciblant la synthèse des acides aminés : groupes 2 et 9 de la classification de HRAC :

Deux enzymes impliquées dans la synthèse des différents types d'acides aminés sont particulièrement ciblées par les herbicides : **l'AcétoLactate Synthase (ALS)** impliquée dans la synthèse des acides aminés branchés (leucine, valine et isoleucine) (**figure I-4**) et la **5-EnolylPyruvyl-Shikimate 3-Phosphate Synthase (EPSPS)** impliquée dans celle des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) (**figure I-4**).

L'ALS (également appelée AHAS : acétohydroxyacide synthase) est présente chez les plantes, les micro-organismes, les champignons et les algues et elle permet la synthèse d'acides aminés branchés essentiels qui doivent être apportés par l'alimentation chez les mammifères. Cette enzyme intervient dans les premières étapes de synthèse de la valine et de l'isoleucine et permet donc indirectement de synthétiser la leucine dont l'un des précurseurs est formé pendant la synthèse de valine. Les herbicides ayant comme cible cette enzyme sont donc peu nocifs pour les mammifères et ont donc été très développés au cours du temps (McCourt et Duggleby, 2006). Dans la classification de l'HRAC, 57 herbicides de classes chimiques différentes sont recensés dont le chlorsulfuron (**figure I-4**) mis sur le marché en 1982. Dans les années 1980, des études ont supposé que la baisse des acides aminés branchés provoquait une baisse de la synthèse protéique mais également une inhibition de la mitose et de la synthèse de l'ADN. Néanmoins, le renouvellement protéique étant accru, la teneur en acides aminés branchés ne semble jamais atteindre un seuil critique et l'accumulation d'autres acides aminés pourrait être à l'origine de la mort de la plante. De plus, l'accumulation des substrats de l'ALS à savoir le pyruvate et le ketobutyrate peut aussi avoir des effets délétères, notamment par l'augmentation de la fermentation cellulaire et la production de molécules potentiellement toxiques (lactate, éthanol, acétaldéhyde) (Q. Zhou *et al.*, 2007).

La 5-EnolylPyruvyl-Shikimate 3-Phosphate Synthase (EPSPS) est une enzyme impliquée dans la synthèse de 5-EnolylPyruvyl-Shikimate-3-Phosphate (EPSP) à partir de Shikimate-3-Phosphate (S3P) et de PhosphoEnolPyruvate (PEP). Ce composé est un précurseur de la voie

de biosynthèse du tryptophane de la tyrosine et de la phénylalanine. Le seul herbicide inhibiteur de l'EPSPS est le glyphosate qui agit comme un inhibiteur compétitif du PEP en se liant au S3P formant ainsi des complexes glyphosate-S3P-EPSPS (Schönbrunn *et al.*, 2001). Cette inhibition provoque une baisse de la synthèse des acides aminés aromatiques et donc de la synthèse protéique nécessaires au fonctionnement de la plante (Sikorski et Gruys, 1997) (**figure 1-4**).



**Figure I-4 – Structure chimique du chlorsulfuron (herbicide de sous-catégorie 2) et du glyphosate (herbicide de sous-catégorie 9) inhibant la synthèse des acides aminés branchés et aromatiques par l'ALS et l'EPSPS**

#### 1.2.3.2.2 Herbicides ciblant la synthèse de lipides : groupes 1 et 15 de la classification de HRAC :

La synthèse des acides gras est assurée grâce à deux enzymes : l'acétyl CoA carboxylase (ACCase) et l'acide gras synthase.

L'ACCase est présente sous deux formes homomérique et hétéromérique dans le règne végétal qui sont présentes respectivement dans le cytosol et dans le plaste. Cependant les monocotylédones ont deux formes homomériques (une seule chaîne peptidique) dans le cytosol et le plaste (Sasaki et Nagano, 2004). Cette enzyme se charge de la première étape de synthèse des acides gras et doit être présente dans les deux compartiments. En effet, son produit, le malonyl-CoA, ne peut pas traverser la barrière plastidiale et est nécessaire autant dans le cytoplasme pour l'élongation des acides gras à très longue chaîne, la synthèse des flavonoïdes et des anthocyanes, mais aussi dans le plaste pour la synthèse des acides gras (Sasaki et Nagano, 2004). Les composés herbicides du Groupe 1 comme le diclofop-méthyle (**figure I-5 (A)**) n'altèrent l'activité que de l'ACCase homomérique plastidiale spécifique de la famille des Poaceae en agissant comme des inhibiteurs compétitifs et réversibles (Murphy et Tranel, 2019) du substrat de l'enzyme l'acétyl CoA en se liant à des domaines différents de l'enzyme (Takano *et al.*, 2020). Appliqués directement sur les feuilles de plantes en herbicides de post-émergence, ils empêchent la production de lipides ce qui provoque la perte de l'intégrité membranaire, la

fuite de métabolites et la mort de la cellule. Les symptômes sont visibles sur la plante après seulement une semaine d'application et se traduisent par une chlorose et une désintégration des feuilles. (Takano *et al.*, 2020).

La synthèse des acides gras à très longue chaîne peut aussi être la cible de molécules herbicides (Groupe 15 de la classification HRAC). Ces acides gras possèdent un nombre d'atomes de carbone supérieur à 18 et sont les précurseurs de différents types de lipides comme les phospholipides et les sphingolipides. (Batsale *et al.*, 2021). Les herbicides comme le métazachlore (**figure I-5 (B)**) ayant pour cible cette voie métabolique inhibent les élongases qui permettent la synthèse de ces acides gras à très longue chaîne (Böger *et al.*, 2000).

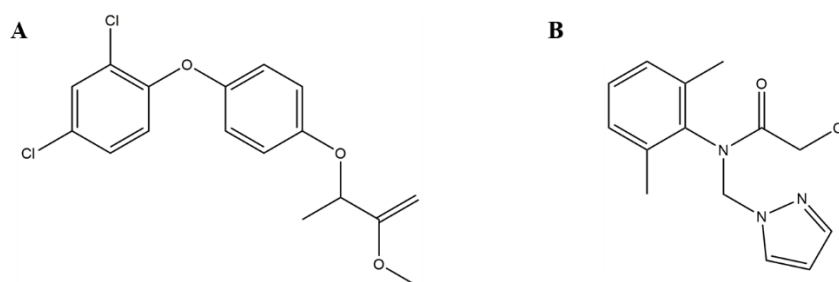


Figure I-5 – Structure chimique du diclofop-méthyle (A) et du métazachlore (B)

### 1.2.3.3 Impact sur la division cellulaire et la croissance :

La dernière cible des herbicides est la division cellulaire et la croissance. En effet, certains herbicides peuvent mimer les phytohormones (les auxines en particulier) ou inhiber leur transport mais également inhiber l'assemblage et l'organisation des microtubules (comme la trifluraline).

Les auxines sont des hormones végétales qui permettent l'élongation cellulaire, l'initiation des racines, la différenciation des méristèmes et la senescence. Elles sont caractérisées par leur structure présentant un cycle aromatique et une fonction acide carboxylique (Grossmann, 2010). A l'état naturel, les plantes produisent l'acide 3-indole acétique (AIA), l'acide phénylacétique et l'acide indole 3-butyrique (IBA) (**figure I-6**). Des auxines synthétiques ont aussi été développées : l'acide naphthalène acétique (ANA), l'acide dichlorophenoxyacétique (2,4-D), le dicamba ou le piclorame par exemple (Beyl, 2004). Elles ont une durée de vie plus longue dans la plante car elles ne sont pas dégradées aussi rapidement que les auxines naturelles. Le 2,4-D, le piclorame et le dicamba sont utilisés comme herbicides depuis plusieurs décennies, avec une première utilisation du 2,4-D dans les années 1940. A haute concentration, ces hormones de synthèse vont provoquer la mort de la plante, en accélérant la senescence des feuilles induisant une **chlorose** puis une nécrose (Grossmann, 2010). Ces hormones sont utilisées en tant qu'herbicide de post-émergence et peuvent avoir des sélectivités variées en fonction de leur classe chimiques (Grossmann, 2010) (Heap, 2022).

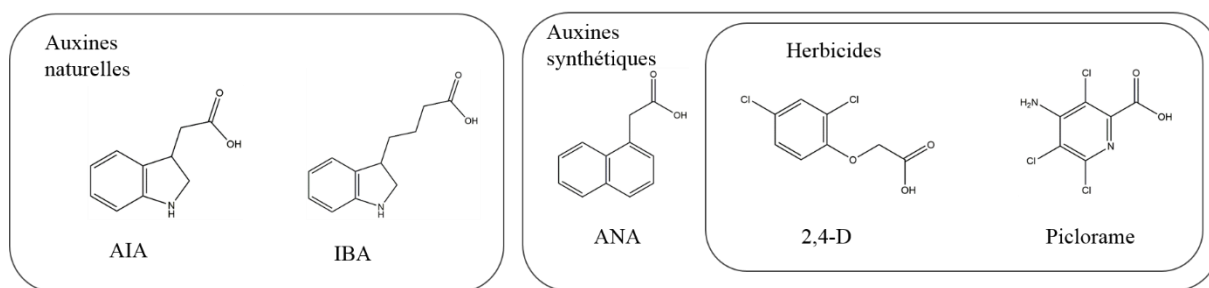


Figure I-6 – Structure des auxines naturelles et synthétiques dont certaines sont utilisées comme herbicides

Les molécules herbicides décrites précédemment ont des mécanismes d'action différents et appartiennent à des familles chimiques variées. L'atrazine est une triazine, la sulcotrione est une trikétone et le 2,4-D est un phenoxy-carboxalate. Néanmoins, au niveau de leurs structures, elles contiennent globalement toutes des hétérocycles azotés ou des atomes de fluor, chlore ou soufre. En se basant sur les molécules herbicides connues et sur leur mode d'action, de nouveaux composés sont recherchés encore aujourd'hui. Par exemple, l'étude de Ruszkowski and Forlani (2022) vise à mieux comprendre l'enzyme cible du glyphosate (l'EPSPS) pour identifier ou synthétiser de nouveaux herbicides ayant la même cible biologique.

Certains modes d'action sont plutôt bien décrits alors que d'autres restent plus mystérieux, une sous-catégorie d'herbicides classée par l'HRAC contient 16 molécules dont l'acide pelargonique qui ont des modes d'action inconnus.

### 1.2.4 Sélectivité :

Les herbicides peuvent être spécifiques de certaines catégories de plantes ou non. Certains ne vont détruire que les plantes adventices sans atteindre les cultures. Par exemple, le 2,4-D et le dicamba vont avoir un effet sur les dicotylédones mais non sur les monocotylédones. Ils peuvent donc être utilisés pour réduire la présence d'adventices dicotylédones dans les cultures de graminées. Certains autres herbicides ne vont pas avoir de sélectivité et vont être utilisés pour l'entretien de sites industriels, de rails ou de terrains en friche comme le glyphosate (Shahena *et al.*, 2020).

Pour accroître la sélectivité des herbicides comme le glyphosate, des industries du secteur agricole ont mis au point des variétés résistantes à ce type d'herbicides en modifiant génétiquement des plantes. Cette pratique a commencé dans les années 1990 avec des plantes génétiquement modifiées pour développer une résistance au glyphosate et au glufosinate. Concernant la résistance au glyphosate, ces plantes disposent d'EPSPS (enzyme de synthèse des acides aminés aromatiques) (**figure I-4**) dérivée d'*Agrobacterium* spp. insensible au glyphosate ou d'enzymes qui dégradent le glyphosate de façon à les rendre moins sensibles (Schütte *et al.*, 2017).

Pour augmenter la sélectivité des herbicides il est également possible d'ajouter des phytoprotecteurs à la formulation de l'herbicide qui permettent une détoxification plus rapide de l'herbicide chez les plantes traitées (Kraehmer *et al.*, 2014). Ces composés sont utilisés avant ou pendant l'application de l'herbicide auquel ils sont associés pour protéger les cultures de céréales par exemple. Les phytoprotecteurs peuvent même être développés en parallèle de nouveaux composés herbicides comme le développement de cyprosulfamide (phytoprotecteur) et de thiencarbazone-méthyl (herbicide) qui est un inhibiteur de l'ALS. L'association des deux composés permet de réduire l'activité de l'herbicide dans les plants de maïs mais ne fonctionne pas pour les plants de blé, ce qui implique une sélectivité des phytoprotecteurs également (Giannakopoulos *et al.*, 2020).

### **1.2.5 Les avantages des herbicides :**

L'utilisation des herbicides a permis une augmentation du rendement des cultures par exemple aux États-Unis le rendement/hectare du maïs est passé de 28,9 en 1940 à 152,8 en 2010 (Kraehmer *et al.*, 2014). Les rendements des cultures en ligne ou fourragère a doublé avec le recours à l'utilisation de produits phytosanitaires aux États-Unis en 10 ans. Cette solution est peu chère, facile à mettre en œuvre contrairement aux méthodes traditionnelles comme le labour, qui est demandeur en énergie et qui peut provoquer des problèmes d'érosion (Kraehmer *et al.*, 2014).

### **1.2.6 Les problèmes causés par les herbicides :**

#### **1.2.6.1 Problèmes environnementaux et en santé humaine :**

Les herbicides ont des avantages sur la production alimentaire mondiale, mais ils ont aussi des effets délétères sur l'environnement et les espèces non ciblées. Depuis les années 2000 de nombreux herbicides ont été interdits d'usage en Europe comme l'atrazine en 2004 et le paraquat en 2007. Pour d'autres herbicides, les preuves de la toxicité sont plus difficiles à établir et l'impact négatif du glyphosate est par exemple sujet à controverse. En effet, le glyphosate ciblant l'EPSPS non présente chez les mammifères, sa toxicité devrait être limitée, néanmoins des études sur le Roundup ont montré une augmentation de l'apparition de tumeurs et une baisse de la fertilité chez le rat après exposition (Van Bruggen *et al.*, 2018). Certaines études mettent en avant la toxicité des adjuvants utilisés dans sa formulation plutôt que le composé lui-même (Seralini et Jungers, 2020). La réglementation concernant les herbicides est donc susceptible d'évoluer en fonction des mises en évidence des effets néfastes de ces composés.

L'atrazine, un herbicide ayant comme cible les protéines du photosystème II peut diminuer la photosynthèse d'espèces non-cibles comme le phytoplancton, ce qui cause des changements dans la chaîne alimentaire dont il est le premier maillon. Cette molécule provoque

également des changements au niveau du comportement de certains poissons et affecte leurs branchies (Graymore et al., 2001).

D'autres herbicides comme le 2,4-D sont étudiés pour déterminer leur impact sur l'environnement et la santé humaine avec un impact sur les poissons, mais également sur les bactéries et une toxicité supposée pour l'Homme. Le 2,4-D a également un impact sur les espèces végétales non-cibles comme les fougères, ou des plantes aquatiques (Islam *et al.*, 2018).

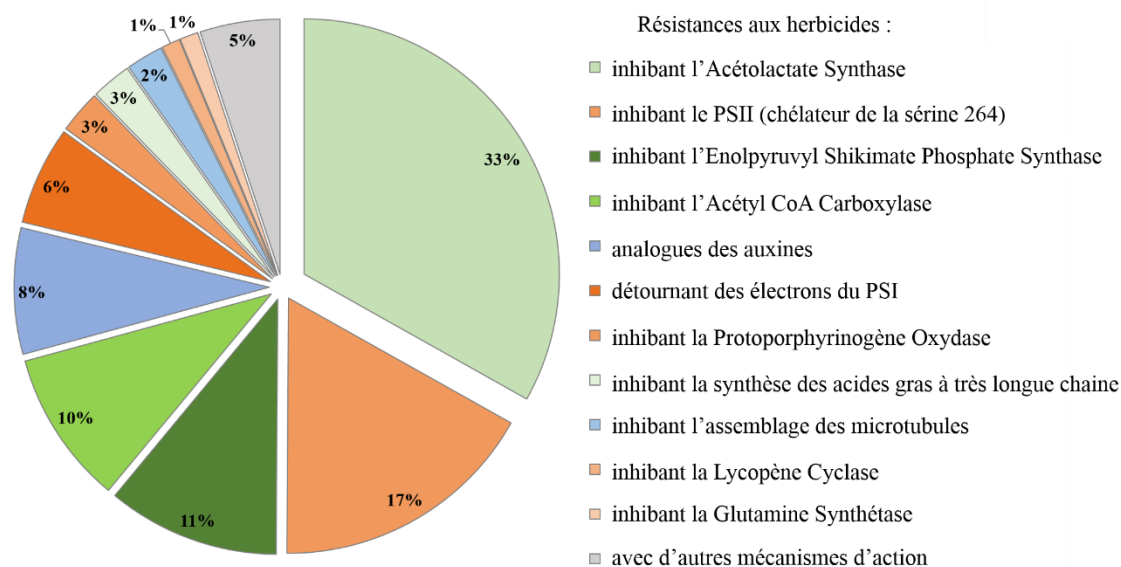
En plus, des toxicités sur les espèces non-cibles, les herbicides affectent également la physiologie des espèces cibles avec l'apparition de phénomènes de résistances.

#### 1.2.6.2 La résistance aux herbicides :

L'utilisation massive des herbicides a créé une pression de sélection sur les plantes adventices, favorisant les individus ayant une sensibilité moindre à leur action et augmentant au fil du temps la population de plantes résistantes (Délye *et al.*, 2013). L'HRAC recense sur le site weedscience (Heap, 2022) les cas de résistances individuelles uniques, ce qui signifie que pour chaque espèce de plante, la résistance à un herbicide (ou un groupe d'herbicide) donné est recensé, sachant qu'une espèce peut être multi-résistante. Au total, 513 cas de résistance ont déjà été observés dont 12 depuis le début de l'année 2022. Ces résistances classées en fonction des mécanismes d'action des herbicides déjoués sont présentées en **figure I-7**. Les plantes développant des résistances sont au total autant des dicotylédones que des monocotylédones, avec tout de même une prédominance des dicotylédones résistantes aux herbicides inhibant l'acétolactate synthase et le photosystème II et aux analogues d'auxines.

En plus de ces cas de mono-résistance, de plus en plus d'espèces développent des résistances multiples, avec une prévalence des doubles résistances (plus de 106 espèces recensées en 2020). Parmi les 12 nouveaux cas d'espèces résistantes recensées à travers le monde depuis le début de l'année 2022, 5 cas sont des adventices multi-résistantes. Parmi les espèces multi-résistantes, l'ivraie à épis serrés (*Lolium rigidum* Gaudin) et le pâturin annuel (*Poa annua* L.) sont celles qui ont développé le plus grand nombre de résistances simultanées avec un maximum de 12 résistances (chacune à un mode d'action différent), suivies de l'amaranthe du palmier (*Amaranthus palmeri* S.Watson) et du panic pied de coq (*Echinochloa crus-galli* (L.) P.Beauv. var *crus galli*) avec 9 résistances. Dans le top 15 de ces espèces résistantes, certains genres semblent enclin à développer des multi-résistances : 3 sont du genre *Lolium*, 3 *Amaranthus* et 2 *Echinochloa* (Heap, 2022).





**Figure I-7 – Répartition des cas de résistances par groupes d'herbicides répertoriés en fonction du site d'action. En nuances de vert : résistance aux herbicides impactant le métabolisme cellulaire, en orange ; résistance aux herbicides impactant l'activation par la lumière des ROS, en bleu : résistance aux herbicides impactant la division cellulaire et la croissance. Adapté de Heap, I. The International Herbicide-Resistant Weed Database. En ligne. Mercredi 22 juin 2022.**

Comme décrit dans les paragraphes précédents, certains herbicides ont comme cible une enzyme qui, n'ayant pas le bon substrat ou étant sous exprimée, ne peut plus remplir sa fonction dans les cellules végétales. La résistance à ces herbicides peut être due à différentes adaptations impactant directement le site d'action de l'herbicide ou l'empêchant d'atteindre sa cible (Takano *et al.*, 2020) (**tableau I-2**). Par exemple, une mutation peut induire la modification d'un acide aminé sur la chaîne peptidique de l'enzyme au niveau du site actif ce qui peut modifier l'affinité de l'herbicide pour l'enzyme (Yu *et al.*, 2009). Le mécanisme de résistance peut également être lié à des mécanismes de détoxification ou de translocation de la molécule herbicide (Yu *et al.*, 2009).

Pour un mode d'action donné, différentes adaptations peuvent être combinées. C'est par exemple le cas des espèces d'Amaranthe (*Amaranthus palmeri* S.Watson) dans la publication de Nakka *et al.*, (2017). Des modifications sur la séquence peptidique de l'enzyme peuvent apporter une résistance aux inhibiteurs de l'ALS et l'herbicide est détoxifié grâce à l'intervention des cytochromes P450. En effet lors de l'ajout d'inhibiteur de l'activité des cytochromes P450, les espèces résistantes redeviennent sensibles à l'herbicide concerné. Les cytochromes P450 sont impliqués dans la biotransformation de plusieurs types de molécules grâce à diverses réactions chimiques : hydroxylation, déméthylation, oxydation... mais les cytochromes impliqués dans ce mécanisme de résistance sont difficiles à identifier (Dimaano et Iwakami, 2021).

Concernant les cas de multi-résistances, certaines espèces comme deux populations d'ivraie à épi serré (*Lolium rigidum* Gaudin) ont développé des résistances au glyphosate (inhibiteur de l'ESPS), au chlorsulfuron (inhibiteur de l'ALS) et au diclofop-méthyle (inhibiteur de l'ACC) grâce à des mécanismes spécifiques. La résistance au glyphosate est due à une translocation de la molécule localisée au niveau des extrémités foliaires, ce qui permet d'avoir une action très réduite du produit et non la mort de la plante. Pour les résistances aux inhibiteurs d'ALS et d'ACC, elles seraient dues à l'implication de cytochromes (Yu *et al.*, 2009).

**Tableau I-2 – Mécanismes de résistance mis en place en fonction de l'étape d'action de l'herbicide. Adapté de Délye *et al.* (2013)**

Étapes de l'action de l'herbicide	1	2	3	4	5
	Pénétration de l'herbicide	Translocation de l'herbicide au site d'action	Accumulation au niveau du site d'action	Liaison à la cible	Dommages cellulaires, mort de la plante
Mécanismes de résistance	Réduction de la pénétration	Réduction de la translocation ou compartimentalisation	Détoxification de l'herbicide	Surproduction de la cible Mutation de la cible	Compensation ou protection

## 2. Une alternative – les produits de biocontrôle ?

Les herbicides bien qu'ayant des avantages, présentent des inconvénients non négligeables comme la toxicité sur les espèces et la multiplication des cas de résistances chez les plantes adventices. Il est possible d'utiliser des méthodes plus naturelles pour lutter contre les adventices comme la rotation des cultures qui évite l'installation durable des mauvaises herbes et maintient la pression de sélection en créant de la compétition pour les ressources (Nichols *et al.*, 2015) mais elle implique plusieurs changements à mettre en place. D'autres agricultures plus respectueuses de l'environnement se développent également comme l'agriculture biologique qui représente, en 2022, 10 % de la surface cultivée en France et pour laquelle la liste des produits phytosanitaires autorisés est limitée. Mais la transition entre ces deux modes de cultures prend du temps, les agriculteurs ne pouvant se permettre de changer drastiquement leur façon de cultiver sans avoir de garantie sur la production. Il est donc nécessaire de trouver une alternative permettant à la fois de garantir une production alimentaire suffisante mais également de réduire au maximum l'impact sur l'environnement.

Cela se traduit en Europe par la directive 2009/128 « utilisation durable des pesticides » et en France par la mise en place de plans décennaux visant à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires. Ce premier plan Ecophyto a été mis en place en 2008 et est appelé le plan Ecophyto 2008. Il avait pour objectif une réduction de 50% de l'utilisation des produits

phytosanitaires pour 2018 (Chambre d'Agriculture France, 2022). Ce premier plan a permis d'initier des actions comme la création de fermes pilotes (DEPHY), d'augmenter le nombre de fermes en agriculture biologique, mais au niveau national une hausse de 5% de l'utilisation des produits phytosanitaires a été enregistrée entre 2009-2011 et 2011-2013. Face à ces résultats, le plan 2008 a été remanié en 2015 pour devenir le plan EcoPhyto II. Ce nouveau plan vise toujours une diminution de 50% de l'utilisation des produits pharmaceutiques en 10 ans et en deux temps avec un bilan à mi-parcours : 25% de réduction d'ici 2020 et 50% d'ici 2025 (Ministère de la transition écologique et des solidarités, 2018). En 2020, le bilan fait état entre autres d'une réduction de 93% de la vente des substances actives classées CMR1 (substances cancérogènes, mutagènes et reprotoxiques avérées ou présumées) par rapport à 2016 et d'une stabilisation de l'utilisation du glyphosate. De nouvelles restrictions d'usage ont été mises en place en 2021 concernant son utilisation (acceptée uniquement quand aucune autre solution n'est envisageable). Une diminution drastique de son utilisation devrait donc être observée dans les années à venir (Gouvernement français, 2021).

Depuis 2018, le plan EcoPhyto II a évolué en plan EcoPhyto II+ en gardant les mêmes objectifs que le plan EcoPhyto II mais en consolidant certains points avec notamment une reconnaissance des produits de biocontrôle et des préparations naturelles peu préoccupantes. Pour favoriser leur développement, une procédure accélérée pour leur mise sur le marché a été adoptée ([agriculture.gouv.fr](http://agriculture.gouv.fr)). Un dossier doit être déposé sur le site de l'Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail (ANSES) puis le produit va être évalué par l'ANSES avec un délai réduit par rapport aux demandes de mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques classiques (6 mois contre 12 normalement). Les préparations naturelles peu préoccupantes qui sont les substances de base et les substances naturelles à usage stimulant sont quant à elles exemptées de demande de mise sur le marché (Anses, 2022).

Les produits de biocontrôle sont l'ensemble des méthodes de protection des végétaux basés sur l'utilisation de mécanismes naturels. Ils peuvent être des macro-organismes ou des produits phytosanitaires composés de micro-organismes (17% des produits de biocontrôle), de médiateurs chimiques comme les phéromones ou des [kairomones](#) (12%), ou de substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale (71%) (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2022). Les macro-organismes (nématodes, insectes, acariens, invertébrés) sont utilisés pour lutter contre les bio-agresseurs, les micro-organismes (champignons, bactéries, virus) pour lutter contre les ravageurs et les maladies. Les médiateurs chimiques sont quant à eux utilisés pour lutter contre les insectes en contrôlant les populations (par exemple les pièges à phéromones). En effet, ces composés volatils ou non, sont perçus par l'odorat et le goût et permettent de transmettre des informations de danger, de stress, d'indication de ressources alimentaires (Institut technique de l'agriculture biologique *et al.*, 2013).

Enfin, les substances naturelles utilisées dans le biocontrôle <sup>3</sup> peuvent avoir des effets divers en fonction du type de molécules ou d'extraits utilisés. Les substances d'origine animale sont principalement répulsives : la graisse de mouton permet par exemple de lutter contre les biches et les chevreuils. Celles d'origine minérale peuvent avoir plusieurs actions : molluscicide pour le phosphate ferrique, fongicide pour le phosphonate de disodium et le soufre ou encore insecticide pour le silicate d'aluminium. Concernant les substances d'origine végétale, elles peuvent avoir des actions nématicides comme l'extrait d'ail, fongicides comme les mélanges eugénol/thymol/géranol ou encore insecticides comme l'huile essentielle d'orange (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2022). Quelques molécules sont utilisées comme herbicides mais un seul composé d'origine végétale est commercialisé en France avec cette action : l'acide pélargonique. Ce dernier fait l'objet d'une controverse quant à son utilisation, des études s'interrogeant sur sa toxicité malgré son utilisation dans les produits alimentaires et le fait qu'il soit catégorisé « généralement considéré comme sûr » en 2001 (Hall et Oser, 1970). L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA) a publié un rapport en 2021 qui classe l'acide pélargonique de qualité alimentaire comme irritant pour la peau (comme beaucoup de produits chimiques), mais avec un faible risque aigu et à long terme pour les mammifères et les oiseaux ce composé étant déjà présent dans la nature à faible concentration. Certaines formulations contenant de l'acide pélargonique ont néanmoins été jugées toxiques pour les abeilles (European Food Safety Authority *et al.*, 2021). En revanche au niveau mondial, certains herbicides tolérés en agriculture biologique ont des principes actifs issus de plantes (huiles essentielles ou acides gras) et sont utilisés en association avec de l'acide acétique (vinaigre) ou de l'acide citrique (Dayan *et al.*, 2009).

Les produits de biocontrôle d'origine végétale sont très peu utilisés, pourtant les plantes produisent et relarguent dans l'environnement des composés ayant différentes fonctions dont certaines leur permettant de se développer plus facilement. De tels composés pourraient être à la base de la conception de nouveaux produits phytotoxiques naturels.

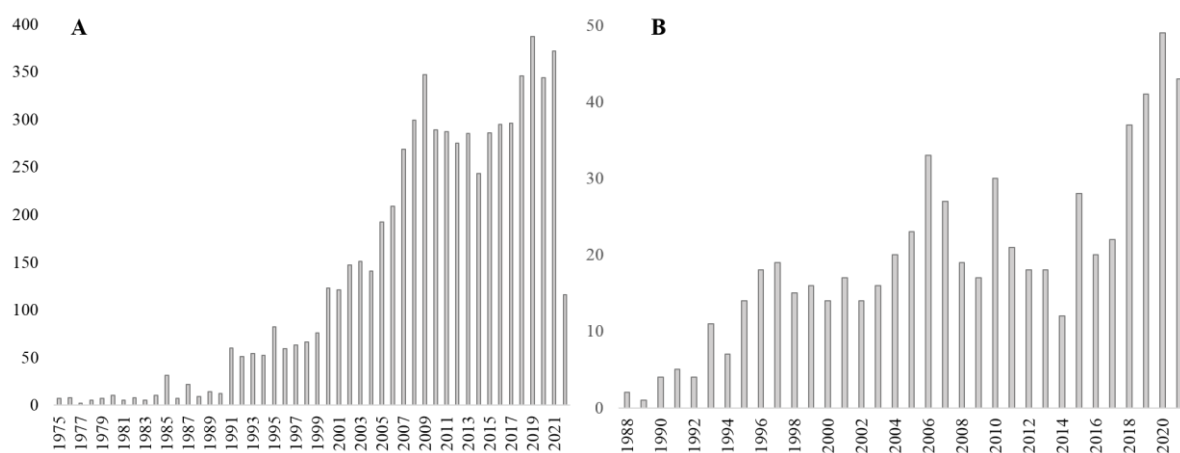
## **2.1 Allélopathie :**

Les organismes vivants (champignons, micro-organismes, plantes, virus) communiquent avec leur environnement en induisant des effets positifs ou négatifs sur les organismes avoisinants (y compris sur les mammifères) influençant ainsi le développement d'écosystèmes biologiques ou agricoles (De Albuquerque, 2011). Ce phénomène a été appelé allélopathie du grec *allêlôn*, réciproque et *pathos*, souffrance (sensible ou sensation). Il a été défini dans un premier temps par Hans Molish comme étant des interactions positives et négatives. En 1984, Elroy L. Rice a ajouté à cette définition la notion de composés relargués dans l'environnement pendant ces interactions (Bhadoria, 2010).

---

<sup>3</sup> Liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle disponible en Annexe 2

L'intérêt croissant pour l'allélopathie et les bioherbicides (produits de biocontrôle permettant de contrôler la prolifération des adventices) (Radhakrishnan *et al.*, 2018), se traduit par la production scientifique sur ces deux sujets au cours des dernières années (**figure I-8**). L'allélopathie a été un sujet d'intérêt dès les années 1970 avec quelques publications recensées puis le nombre de publications a explosé dans les années 2000 avec plus de 100 publications par an. Depuis une dizaine d'années, on peut observer une stabilisation à 350 nouvelles publications sur ce sujet par an. L'intérêt pour les bioherbicides est apparu plus tard vers la fin des années 1980 avec une augmentation sur le long terme. En 30 ans, le nombre de publications sur le sujet a quadruplé, mais il reste modeste avec une cinquantaine de nouvelles publications par an.



**Figure I-8 – Nombre de publications par an d'après la base de données Web of Science pour les mots clés « allelopathy » en A et « bioherbicide » en B (Base de données, Web of Science)**

Les molécules produites par les plantes sont nommées composés allélopathiques et peuvent être impliqués dans les interactions plantes-plantes, plantes-micro-organismes ou plantes-herbivores. (Weir *et al.*, 2004). Dans ce manuscrit, les composés allélopathiques issus uniquement de plantes seront traités.

En effet, les plantes sont des organismes sessiles (relativement statiques) et produisent un arsenal de molécules appelées métabolites secondaires ou spécialisés. Ces derniers diffèrent des métabolites primaires essentiels au développement de la plante et qui sont les glucides, les lipides, les acides nucléiques et les protéines. Ces métabolites secondaires peuvent avoir des structures variées et permettent aux plantes de s'adapter à des stress biotiques (notamment des prédateurs), ou abiotiques. Ils leur confèrent également d'autres avantages comme la mise en place de relations avec les micro-organismes du sol, l'inhibition de la croissance des plantes alentours ou l'attraction des pollinisateurs. Ils sont répartis en trois grandes classes : les composés terpéniques, les composés phénoliques et les alcaloïdes.

Les composés allélopathiques sont produits par différentes parties de la plante ; les feuilles, les fleurs, l'écorce et les racines (**figure I-9**) et peuvent entrer dans l'environnement

via différents mécanismes. Ces composés peuvent être des molécules volatiles, libérées dans l'air, c'est le cas des composés terpéniques comme l' $\alpha$ -pinène produit par les espèces d'*Eucalyptus* (S. Kaur *et al.*, 2011). Les composés non volatils peuvent quant à eux être libérés dans l'environnement par le lessivage des feuilles par la pluie. Les composés peuvent être « extraits » de la feuille et rester à sa surface ou être entraînés vers le sol. De la même façon quand les feuilles tombent au sol à cause d'une perturbation environnementale ou d'une senescence, les composés présents se retrouvent au niveau de la litière du sol. Ils peuvent y être dégradés par les microorganismes, transformés en d'autres composés ou y persister un certain temps (De Albuquerque *et al.*, 2011). Enfin les composés peuvent être exsudés par les racines au niveau de la rhizosphère (zone du sol qui entoure et qui est influencée par les racines des plantes) (Bais *et al.*, 2006). Les exsudats racinaires sont des sécrétions d'ions, d'eau et de métabolites primaires et secondaires de la racine vers la rhizosphère en deux temps (l'excrétion et la sécrétion). Ces composés peuvent avoir des rôles divers avec notamment la mise en place d'interactions plante-plantes ou plante-microorganismes (Bais *et al.*, 2006). Divers composés allélopathiques ont déjà été identifiés dans les exsudats de plantes comme la sorgoléone (*Sorghum* spp) et la ( $\pm$ ) catéchine (*Centaurea maculosa* Lamk.) (Bais *et al.*, 2006). Ces composés comme les herbicides conventionnels ont des structures et des polarités variées ainsi que des modes de libérations dans l'environnement différentes. Leurs mécanismes d'actions et leurs cibles métaboliques sont donc également variés.

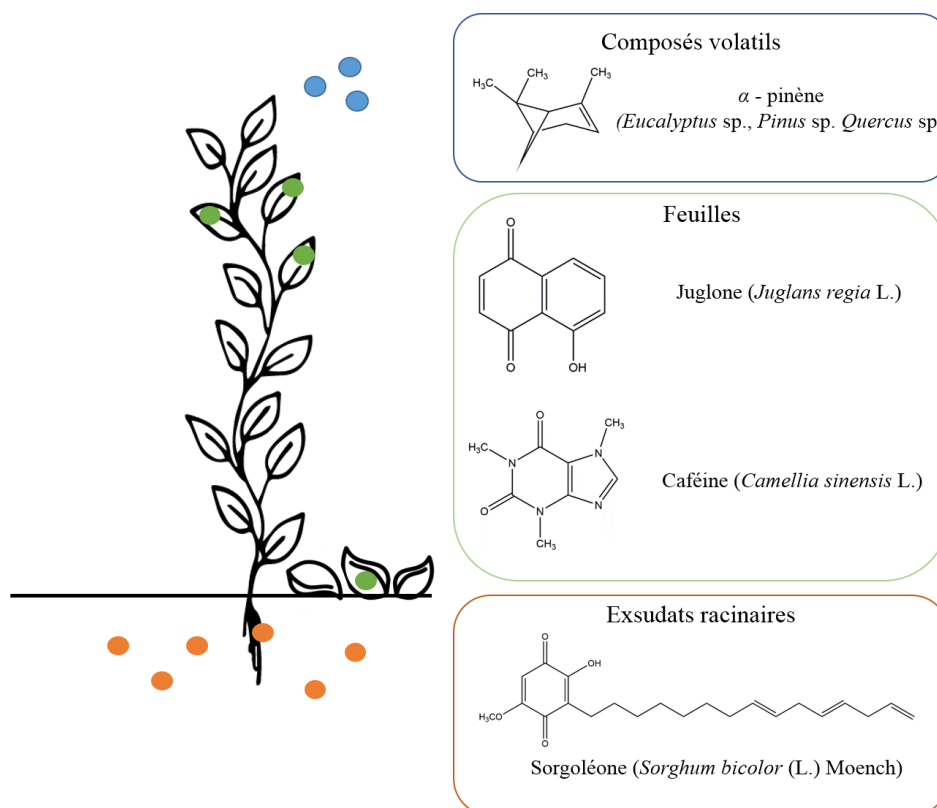


Figure I-9 – Schéma des différents moyens de libération dans l'environnement des composés allélopathiques et quelques exemples. Adapté de Weir *et al.* (2004), et de De Albuquerque *et al.* (2011)

## **2.2 Mécanismes d'action des composés allélopathiques ayant une activité bioherbicide :**

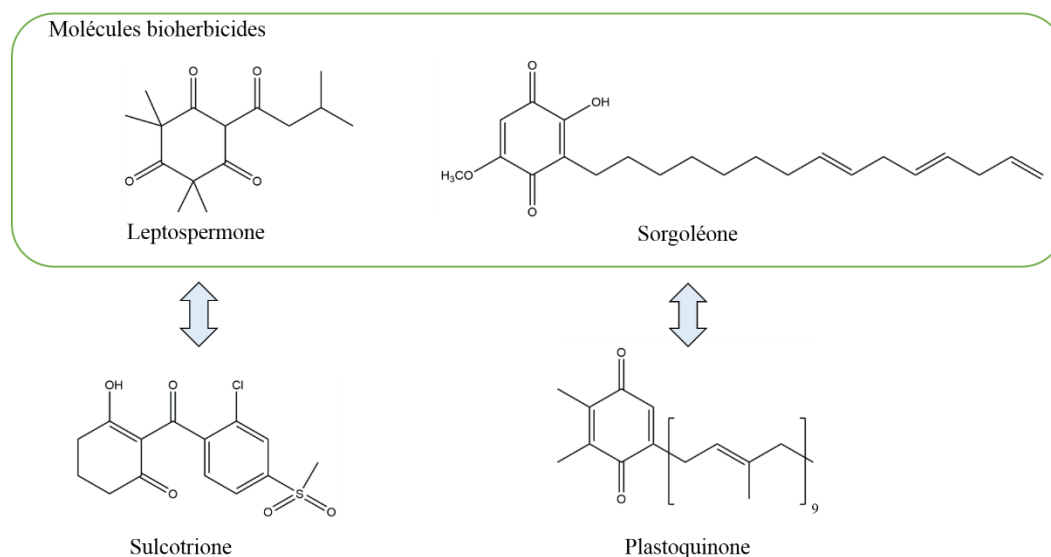
L'identité des molécules allélopathiques est, pour certaines, connue comme pour la juglone produite par *Juglans nigra* L. (noyer noir) qui inhibe la germination des graines de cresson et de tomate (Kocacë Aliskan et Terzi, 2001) (**figure I-9**), ou certaines hormones comme l'acide abscissique ou l'acide jasmonique.

Leurs mécanismes d'action sont, pour certains similaires à ceux observés pour les herbicides conventionnels. Pour déterminer leur mécanisme d'action les mêmes expériences que pour les herbicides conventionnels sont utilisées, comme des observations morphologiques et des études physiologiques telles que la détermination de l'index mitotique, la perte d'intégrité des membranes plasmiques.

Certains bioherbicides agissent sur la graine et la germination alors que d'autres ciblent plutôt les plantules déjà formées. Les composés phénoliques induisent une baisse de l'activité de l' $\alpha$ -amylase (qui hydrolyse l'amidon en sucre) ce qui provoque un retard de germination. (Radhakrishnan *et al.*, 2018). Les huiles essentielles peuvent provoquer un endommagement de l'ADN et une perturbation de la mitose, ce qui réduit la croissance de la plantule.

Comme pour les herbicides conventionnels, les bioherbicides peuvent agir sur la croissance et le développement cellulaire en ciblant l'expression des hormones provoquant par exemple la surexpression d'acide abscissique et d'acide jasmonique, causant une fermeture des stomates (Radhakrishnan *et al.*, 2018). Le stress oxydatif peut également être un mode d'action. Les monoterpènes d'huile essentielle de *Nepeta meyeri* Benth. une plante de la même famille que l'herbe à chat, inhibent les enzymes de détoxification des ROS des plantes cibles comme la superoxyde dismutase (Amaranthe réfléchie *Amaranthus retroflexus* L. et pourpier *Portulaca oleracea* L.) provoquant une accumulation de ROS comme l' $O_2^{\bullet -}$  (Mutlu et Atici, 2009).

Les composés bioherbicides peuvent également présenter des ressemblances avec des composés commerciaux comme la leptospermonone qui a inspiré la synthèse de divers analogues comme la sulcotrione (Duke *et al.*, 2000) ou avec des molécules biologiques comme la sorgoléone qui ressemble à une plastoquinone et va donc impacter le fonctionnement des photosystèmes (Dayan *et al.*, 2000) (**figure I-10**).



**Figure I-10 – Comparaison de la structure de composés naturels phytotoxiques : la sorgoléone et la leptospermone, avec une molécule biologique : la plastoquinone, ou un herbicide commercial : la sulcotrione. Adapté de Dayan *et al.* (2000)**

Les mécanismes d'action des composés bioherbicides sont diversifiés, comme pour les herbicides traditionnels. Néanmoins, avec l'essor des tests de phytotoxicité des plantes, de nouvelles structures naturelles peuvent émerger et avec elles de nouveaux mécanismes d'action qui permettrait de palier aux phénomènes de résistances existants. Néanmoins pour limiter l'apparition de ces résistances des approches multi-cibles semblent appropriées.

Ainsi, dans le but d'identifier ces nouvelles molécules dans les plantes, diverses méthodes sont utilisées en fonction du type de matrices étudiées (extrait, molécules volatiles...).

### **2.3 Les méthodes utilisées pour la mesure de la phytotoxicité de produits naturels d'origine végétale :**

En conditions de recherche exploratoire de nouvelles molécules d'intérêt, différentes mesures sont réalisées sur les plantes cibles pour évaluer le potentiel phytotoxique des échantillons testés, notamment la mesure du taux de germination, de la longueur des racines, de l'hypocotyle ou encore de la masse de la plante. Dans ce manuscrit, les tests permettant de déterminer le taux de germination et la croissance de la racine sont détaillés car ce sont les plus couramment utilisés. Pour ces mesures, différentes méthodes ont été développées en fonction de la matrice végétale à étudier. Pour étudier les exsudats racinaires, une méthode est privilégiée il s'agit de la « Plant Box Method ». Lors de l'étude de poudre de plante, deux méthodes sont utilisées : la méthode sandwich et la Dish Pack. Enfin pour l'évaluation du potentiel phytotoxique des extraits, fractions ou composés purs, la méthode utilisée préférentiellement est celle en boîte de Petri avec papier filtre.

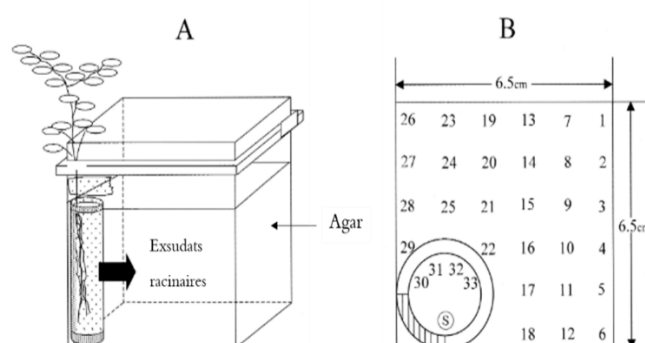
Pour ces 4 méthodes, des graines de plantes cibles sont utilisées pour évaluer l'activité de l'échantillon testé. Certaines graines sont privilégiées notamment en raison de l'homogénéité



de leur taux de germination, de la longueur de la radicule et de l'hypocotyle mais aussi en raison de leur sensibilité aux produits phytotoxiques (Macías *et al.*, 2000). Pour une meilleure évaluation de la sélectivité des échantillons testés, il est aussi recommandé d'utiliser des plantes monocotylédones et dicotylédones. Les plantes cibles les plus utilisées sont pour les monocotylédones, le blé commun (*Triticum aestivum* L.) et la folle avoine (*Avena fatua* L.) et pour les dicotylédones, le cresson (*Lepidium sativum* L.), le radis (*Raphanus sativus* L.) et la laitue (*Lactuca sativa* L.). De plus, certaines études utilisent des adventices présentes dans la zone géographique de l'étude afin d'obtenir des résultats se rapprochant des conditions agricoles réelles (Ismail *et al.*, 2016). Cependant, les plantes adventices sont plus difficiles à cultiver *in vitro*, leur germination étant souvent peu homogène et les graines n'étant souvent pas commercialisées. Les plantes modèles permettent donc d'effectuer un premier criblage de nouveaux extraits ou de nouvelles molécules avant de mener des études plus poussées (en champ par exemple). Le principe des 4 principaux tests est présenté dans les paragraphes suivants.

### 2.3.1 La plante entière – « Plant box Method » :

Lors de ce test, la plante d'intérêt est cultivée pendant quelques jours, elle est ensuite retirée du sol, les racines sont lavées et elle est placée dans une colonne en nylon et disposée dans le coin d'une [boîte Magenta](#). De l'agar est ensuite coulé dans la boîte et des graines de plantes cibles sont disposées dans l'agar à des distances différentes de la plantule. Les graines germées sont ensuite récupérées et la taille de l'hypocotyle et de la radicule est mesurée et comparée à un contrôle sans plantule (**figure I-11**). Cette méthode permet d'évaluer le potentiel allélopathique des exsudats racinaires et a été utilisée pour déterminer l'activité antigermative et d'inhibition de l'élongation racinaire de *Mucuna pruriens* (L.) DC. sur des graines de laitue (Appiah *et al.*, 2015), mais aussi pour étudier le potentiel allélopathique de 19 plantes médicinales pakistanaïses (Syed *et al.*, 2014).

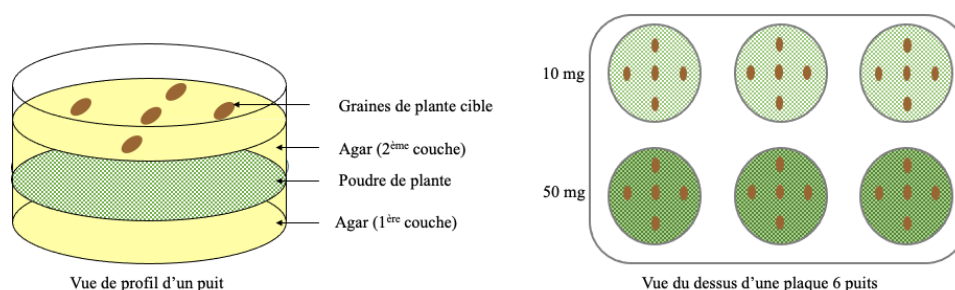


**Figure I-11 – Schéma de la méthode « plant box ».** (A) vue de profil de la boîte avec la plantule positionnée dans un coin de la boîte, (B) vue du dessus avec les numéros des graines déposées sur l'agar et qui sont à différentes distances de la plantule représentée par le S. Adaptée de Parvez *et al.*, (2003)

### 2.3.2 La poudre de plante – Méthode sandwich et Dish Pack :

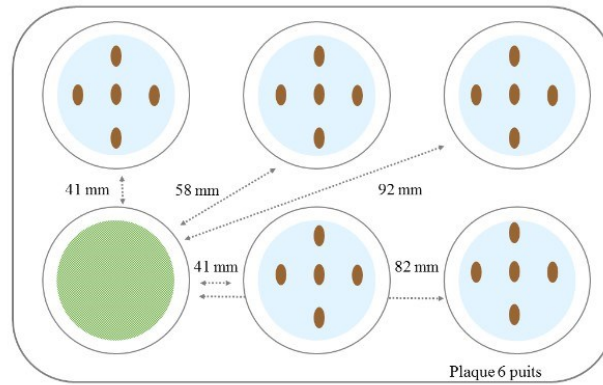
Pour la poudre de plante, la **méthode sandwich** est la plus utilisée et ses paramètres sont semblables peu importe les études (**figure I-12**). Son principe est le suivant, de la poudre de plante (généralement 10 mg et 50 mg) est placée entre deux couches d'agar dans une plaque 6 puits. Ensuite des graines de la plante cible (5 en général) vont être déposées sur la couche supérieure d'agar et après un temps d'incubation, le taux de germination ainsi que la longueur de la racicule et de l'hypocotyle des plantules vont être mesurés (Fujii *et al.*, 2004).

Cette méthode est simple et permet d'effectuer un criblage rapide de poudres de plantes (Morikawa *et al.*, 2012) sans passer par une étape d'extraction qui peut prendre du temps. Cependant, la présence de la couche d'agar entre la poudre et les graines cibles peut limiter la diffusion de certaines molécules qui ne pourront pas atteindre ces graines cibles et avoir une activité, notamment les molécules plus lipophiles. Cela peut conduire à de faux négatifs.



**Figure I-12 – Schéma de la méthode « sandwich » en plaque 6 puits (en vert la poudre de plante, en jaune les couches d'agar).**

Une autre façon d'évaluer l'activité phytotoxique d'une poudre de plante est la méthode « **Dish Pack** » (**figure I-13**), adaptée à l'étude des composés volatils sur des graines de plantes cibles. Dans un puits d'une plaque 6 puits, de la poudre de plante est déposée et dans les cinq autres un papier filtre est imbibé d'eau distillée et des graines de plantes cibles y sont déposées. La plaque est scellée et au bout de quelques jours, l'inhibition de la croissance et de la germination est évaluée en fonction de la distance des puits par rapport au puits contenant la poudre de plante. Fujii *et al.* (2005).

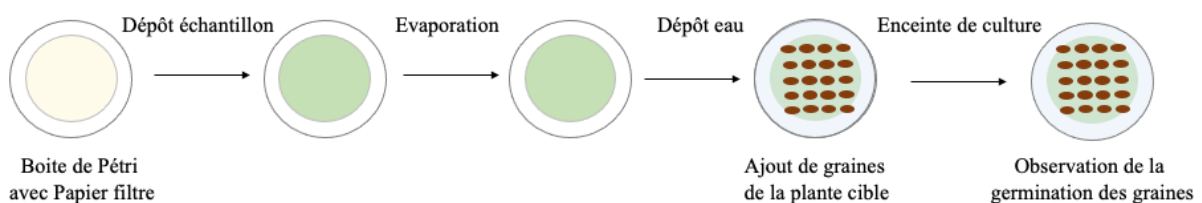


**Figure I-13 – Schéma de la méthode "Dish Pack" en plaque 6 puits, avec en vert la poudre de plante et en bleu la présence de papier filtre imbibé d'eau. Les distances entre les puits de mesure et le puits contenant la poudre de plante sont indiqués en noir.**

Ces deux méthodes ont par exemple été utilisées pour évaluer le potentiel allélopathique de 246 espèces de plantes sino-japonaises (Appiah *et al.*, 2015), 84 plantes ont montré une inhibition de la croissance des racines et de l'hypocotyle des graines de laitue en utilisant la méthode sandwich et 9 ont montrés une activité en utilisant la méthode « Dish Pack ».

### 2.3.3 Les extraits de plantes – Méthode en boîte de Petri sur papier filtre :

Pour les échantillons liquides, une méthode en boîte de Petri contenant du papier filtre est généralement utilisée (**figure I-14**). L'échantillon à tester qu'il soit un extrait ou une molécule pure en solution, est déposé sur le papier filtre et le solvant est ensuite évaporé. De l'eau est ajoutée dans la boîte de Petri et un nombre de graines de la plante cible est déposé. Les graines sont ensuite mises à germer dans une enceinte de culture en conditions de température et de photopériode contrôlées. Au bout de quelques jours (dépendamment du temps de germination de la graine cible), le taux de germination est mesuré ainsi que parfois la longueur de l'hypocotyle et de la radicule.



**Figure I-14 - Schéma de la méthode en boîte de Petri sur papier filtre, avec en vert l'extrait de plante, en bleu la présence d'eau.**

Cette méthode, étant donnée la simplicité de sa mise en place, est utilisée dans un grand nombre d'études. Une liste non exhaustive d'exemples d'applications est présentée dans le

**tableau I-3.** Il est possible de constater que les conditions expérimentales sont variables d'une étude à une autre, avec notamment un volume d'échantillon variant du simple au double en fonction des études (**tableau I-3**). Le diamètre de la boîte de Petri est en général de 9 cm sauf pour l'étude de Li *et al.* (2005) pour laquelle les auteurs ont utilisé des boîtes de 3,5 cm de diamètre. Lors de l'utilisation de ce test, un témoin négatif est souvent utilisé ce qui n'est pas le cas des témoins positifs. Parmi les exemples présentés, seule l'étude de Palacios *et al.* (2010) utilise du 2,4-D comme contrôle positif.

Cette technique bien que permettant de réaliser un criblage des extraits de plantes nécessite des quantités d'échantillon importantes ne permet pas d'identifier les composés actifs d'un extrait complexe.

### 2.3.4 Autres tests *in vitro* :

En complément des 4 tests principaux présentés, d'autres tests plus élaborés peuvent être utilisés pour déterminer la phytotoxicité d'un échantillon.

Des tests de compétition sur le même modèle que la « Plant Box Method » peuvent être utilisés pour étudier l'impact de plantules de plantes à potentiel allélopathique sur la croissance d'espèces cibles. Des graines germées de plantes cibles ainsi que des graines germées de plantes à tester sont disposées dans une boîte de culture du même type que pour la « Plant Box Method ». Le retard de croissance des plantes cibles est mesuré au bout de plusieurs jours. Cette expérience peut être réalisée également avec des plantes de la même espèce pour évaluer l'auto-toxicité des plantes à potentiel allélopathique. C'est par exemple le cas d'une étude sur *Impatiens glandulifera* Royle (Bieberich *et al.*, 2018).

Un autre test permet l'étude de la toxicité résiduelle du sol en récoltant le sol autour des racines d'une plante à potentiel allélopathique. Ce sol peut être utilisé directement en testant la germination et la croissance à son contact direct ou alors une extraction aqueuse peut être réalisée, puis cet extrait est testé avec la méthode en boîte de Petri sur papier filtre (De Albuquerque *et al.*, 2011).

Des tests peuvent également être réalisés pour identifier le mécanisme d'action du composé phytotoxique testé comme la teneur en chlorophylle, l'indice respiratoire des plantules (Batish *et al.*, 2004), l'index mitotique mais également la perte d'intégrité membranaire (Dayan *et al.*, 2000). Les dommages visibles de l'échantillon testé sur les plantules peuvent également être évalués (Batish *et al.*, 2004).

Pour finir, la spécificité d'action des composés phytotoxiques doit être évaluée avec des tests de cytotoxicité et des études toxicologiques avant une éventuelle mise sur le marché ou utilisation à grande échelle car comme l'acide pélargonique certains composés ont un effet néfaste sur les pollinisateurs tels que les abeilles par exemple.

**Tableau I-3 – Liste non exhaustive des conditions expérimentales de tests en boîte sur papier filtre décrites dans la littérature pour mesurer l'activité phytotoxique de diverses plantes ou métaux sur des plantes cibles variées. (EE : Extrait éthanolique, EA : extrait aqueux, HE : huile essentielle, EM : extraits méthanoliques, MP : molécules pures, EC Extrait chloroforme, EMH : extrait méthanol/eau, EEH : extrait éthanol/eau, M : métaux, EH : extrait hexane, EDM : extrait dichlorométhane/eau), nd : non déterminé. En vert, l'étude utilisant des boîtes de Petri de 3,5 cm et en jaune l'étude utilisant des plaques 24 puits.**

Plantes testées	Plantes cibles	Nombre de graines (et répliqués)	Type d'extrait	Volume (concentration d'échantillon) utilisés	Références
Plantes d'Argentine centrale	<i>Avena sativa</i> L. <i>Raphanus sativus</i> L.	20 (3)	EE	2 mL (10 mg/mL)	(Palacios <i>et al.</i> , 2010)
19 plantes d'Asie du Sud Est	<i>Raphanus sativus</i> L.	30 (4)	EA	10 mL (nd)	(Hong <i>et al.</i> , 2003)
<i>Eupatorium maculatum</i> L.	<i>Lolium perenne</i> L. <i>Echinochloa crusgalli</i> L.	30 (3)	HE	5 mL (0,02 – 0,5 mg/mL)	(S. Q. Wang <i>et al.</i> , 2020)
10 plantes tunisiennes	<i>Trifolium incarnatum</i> L. <i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn. <i>Phalaris minor</i> Retz.	10 (3)	EM	2 mL (5 mg/mL)	(Kaab <i>et al.</i> , 2020)
<i>Impatiens parviflora</i> DC.	<i>Raphanus sativus</i> L., <i>Lepidium sativum</i> L., <i>Lactuca sativa</i> L., <i>Triticum aestivum</i> L.	10 (3)	HE	7 mL (0,062 - 2,5 mg/mL)	(Jurová <i>et al.</i> , 2019)
<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle	<i>Raphanus sativus</i> L. cv. "Saxa", <i>Lepidium sativum</i> L. cv. "Inglese", <i>Portulaca oleracea</i> L.	10 (6)	HE, EA, EM, EC	7 mL (1 mg/mL)	(De Feo <i>et al.</i> , 2003)
Allanhone, chaparrine...			MP	7 mL (10 <sup>-4</sup> M)	
<i>Oxalis corniculata</i> L. <i>Oxalis dillenii</i> Jacq.	<i>Lepidium sativum</i> L., <i>Triticum aestivum</i> L., <i>Sinapis alba</i> L., <i>Festuca pratensis</i> L.	25 (4)	EA, EE	5 mL (nd)	(Hódi <i>et al.</i> , 2012)
24 plantes chiliennes	<i>Trifolium repens</i> L., <i>Raphanus sativus</i> L.	30 (3)	EE	4 mL (10 mg/mL)	(Alarcon <i>et al.</i> , 2014)

<i>Pueraria javanica</i> Benth	<i>Eleusine indica</i> L., <i>Cyperus iria</i> L., <i>Chromolaena odorata</i> L.	10 (5)	EA	5 mL (16,7 – 66,7 mg/mL)	(Ismail <i>et al.</i> , 2016)
<i>Solidago canadensis</i> L.	<i>Raphanus sativus</i> L.	10 (5)	EA	4 mL (nd)	(Anžlovar et Anžlovar, 2019)
<i>Impatiens glandulifera</i> Royle	<i>Hieracium murorum</i> L. <i>Scrophularia nodosa</i> L.	25 (3)	EA	3 mL (0,0625 – 0,25 g/mL)	(Ruckli <i>et al.</i> , 2014)
<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud	<i>Poa labillardierei</i> Steud., <i>Lactuca sativa</i> L., <i>Melaleuca ericifolia</i> Sm.	20 (3)	EA	5 mL (2,5 – 10 %)	(Uddin et Robinson, 2017)
<i>Cynara cardunculus</i> L. var. <i>altilis</i> DC.	<i>Amaranthus retroflexus</i> L. , <i>Portulaca oleracea</i> L., <i>Stellaria media</i> L. Vill., <i>Anagallis arvensis</i> L.	25(4)	EA, EMH, EEH	5 mL (nd)	(Scavo <i>et al.</i> , 2020)
<i>Amaranthus sp.</i>	<i>Lactuca sativa</i> L. cultivar Veronica	30(5)	EE	5 mL (0,25 – 4 mg/mL)	(M. S. S. Carvalho <i>et al.</i> , 2019)
<i>Brassica nigra</i> L.	<i>Avena fatua</i> L.	100 (4)	EA	10 mL (4 - 20 mg/mL)	(Turk et Tawaha, 2003)
Métaux Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>	<i>Arabidospis thaliana</i> (L.) Heynh.	50-60	M	0,7 mL (0,2 - 200 mM)	(Li <i>et al.</i> , 2005)
Phytotoxines : trans-cinnamaldehyde, coumarine, nigericin, juglone, plumbagine, benzylisothiocyanate	<i>Medicago sativa</i> L., cv. Vernal, <i>Lolium multiflorum</i> L., Abutilon theophrasti Medic.	20 (4)	MP	4 mL (100 µM)	(Dornbos et Spencer, 1990)
<i>Eragrostis plana</i> Ness	<i>Lactuca sativa</i> L., <i>Agrostis stolonifera</i> L.	5 (2)	EH, EDM, EA	0,02 mL (1mg/mL)	(Favaretto <i>et al.</i> , 2019)

### 3. Identification et production de molécules actives :

Une fois les extraits actifs identifiés à l'aide des tests décrits dans la partie précédente, il est nécessaire de les analyser pour identifier les molécules porteuses de l'activité constatée. Des techniques de séparation comme la chromatographie en phase liquide ou gazeuse sont utilisées et un fractionnement bio-guidé peut également être effectué pour accélérer l'identification des molécules actives. La culture *in vitro* peut ensuite être envisagée pour augmenter la production de ces molécules actives par les plantes.

#### 3.1 Chromatographie en phase Liquide Haute Performance :

##### 3.1.1 Principe :

La chromatographie en phase liquide à haute performance (appelée en anglais High Performance Liquid Chromatography HPLC) est une méthode de séparation des molécules en fonction de leur affinité pour une phase stationnaire et une phase mobile. Cette technique est utilisée pour séparer les molécules de mélanges plus ou moins complexes comme des extraits dans l'objectif de les identifier ou de les quantifier. L'étude de Lobstein *et al.* (2001) par exemple, porte sur l'analyse d'un extrait hydro-alcoolique de feuilles de balsamine de l'Himalaya (*Impatiens glandulifera* Royle (IGR)) par HPLC ainsi que sur la quantification de 2 naphthoquinones présentes dans cet extrait.

La séparation par HPLC se fait entre une phase mobile (composée d'un ou plusieurs solvants) et une phase stationnaire contenue dans une colonne en fonction des différences d'affinité des molécules pour ces deux phases. Une fois les molécules séparées, elles sont détectées et un chromatogramme est obtenu, indiquant un temps de rétention propre à chaque molécule dans des conditions de séparation données. (**figure I-15**).

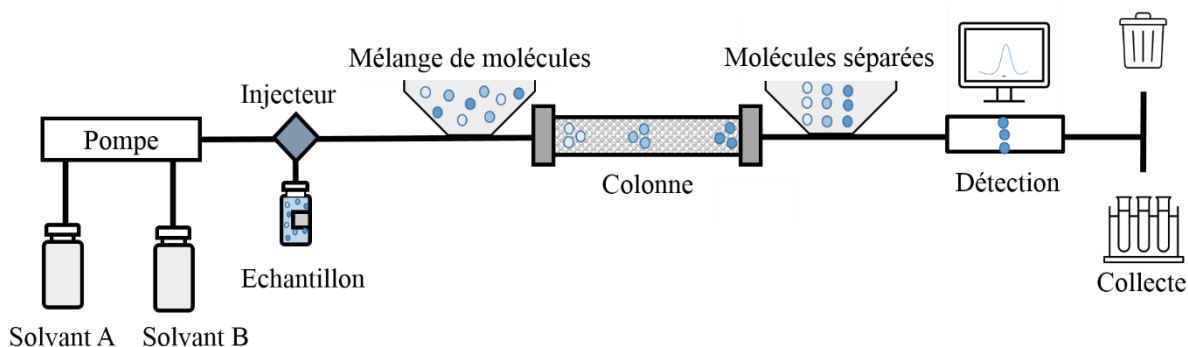


Figure I-15 – Schéma général d'un système de chromatographie liquide à haute performance

Différents types de chromatographie sont utilisés en fonction des molécules à analyser : chromatographie de partage en phase normale (séparation des molécules moins polaires), ou en phase inverse (séparation des molécules polaires), d'échange d'ions (séparation des cations ou des anions), d'exclusion stérique (séparation des molécules en fonction de la taille) ... Dans ce manuscrit, seule la chromatographie de partage en phase inverse a été utilisée et est détaillée.

En chromatographie en phase inverse, la phase stationnaire est en général constituée de silice greffée avec des chaînes carbonées hydrophobes (C18, C6, C4 par exemple), ce qui la rend plus ou moins apolaire en fonction de la longueur de la chaîne carbonée utilisée. Les phases mobiles utilisées sont en général un mélange d'eau et d'un solvant organique moyennement polaire : méthanol ou acétonitrile. Il est possible de faire varier la composition de la phase mobile au cours de l'analyse (mode gradient) ou non (mode isocratique). Différents paramètres sont donc à optimiser pour une analyse donnée afin de trouver un équilibre entre séparation correcte et durée d'analyse.

Après séparation des molécules par la colonne, une étape de détection est nécessaire. Différents types de détecteurs existent selon les propriétés physico-chimiques des molécules à analyser. Le détecteur à barrette de diodes (appelé Diode Array Detector DAD en anglais) permet de mesurer le spectre d'absorbance des composés en balayant une large plage de longueurs d'ondes et est donc adapté pour les molécules présentant des groupements chromophores (responsables de l'absorbance de la lumière UV-visible) comme les polyphénols ou les naphthoquinones. Ce détecteur est non destructif et permet d'utiliser d'autres détecteurs en série.

Les molécules ne présentant pas de groupements chromophores peuvent être analysées avec d'autres types de détecteurs plus universels comme le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL). Après nébulisation de la phase mobile, le DEDL détecte les molécules lorsque celles-ci passent devant un faisceau laser et le dévient. Ce détecteur a été utilisé pour l'analyse de triglycérides dans plusieurs huiles végétales parmi lesquelles l'huile de tournesol ou de noisette (Cunha et Oliveira, 2006) mais également pour l'analyse de sucres tels que le fructose ou le glucose dans des extraits aqueux de fruits (pastèque, pêche) (Ma *et al.*, 2014).

La spectrométrie de masse (en anglais Mass Spectrometry) est également un détecteur de choix pour l'identification de composés. Les spectromètres de masse permettent d'ioniser les molécules et de séparer les ions selon leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Ils se composent de trois parties, une source, un analyseur et un détecteur (**figure I-16**). La source permet d'ioniser les molécules positivement ou négativement. Différentes sources sont utilisables en fonction des molécules à analyser comme l'ionisation chimique à pression atmosphérique, l'impact électronique, l'électrospray. Cette dernière est la source utilisée pour les analyses des chapitres suivants.

L'analyseur permet de séparer les ions selon leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Il peut y avoir une seule étape de séparation (spectrométrie de masse simple) ou deux voire plusieurs étapes de séparation intercalées d'une étape de collision qui permet de focaliser les ions et de les fragmenter. Ces fragments sont ensuite, à leur tour, séparés en fonction de leur  $m/z$  (spectrométrie de masse MS/MS ou en tandem **figure I-16**). Différents types d'analyseurs existent : quadripôle, temps de vol, Orbitrap. S'ils sont à haute résolution, c'est-à-dire capables de séparer des ions de masses très proches, la précision des rapport  $m/z$  obtenue sera au moins de 4 chiffres après la virgule, comme avec le temps de vol. Il est alors possible de prédire la



formule brute d'un composé avec une erreur sur sa masse de quelques ppm et donc de faire des propositions d'identification. Lors d'analyses en MS/MS à l'aide d'un spectromètre de masse à haute résolution, la masse des fragments obtenus peut donner une indication sur la structure des molécules analysées et ainsi orienter l'identification. Dans l'étude de Szewczyk *et al.* (2016), les propositions d'identification des polyphénols de différentes espèces d'*Impatiens* ont été effectuées en utilisant les données obtenues en HPLC couplée à un DAD et à la spectrométrie de masse haute résolution, ces deux détecteurs permettant d'obtenir des informations complémentaires pour l'identification des composés.

Le dernier élément constituant un spectromètre de masse est le détecteur qui va permettre de convertir les signaux électriques des ions en rapports masse sur charge et de les associer à leur temps d'analyse, ce qui permettra de retracer un chromatogramme présentant l'intensité des signaux de masse en fonction du temps de rétention.

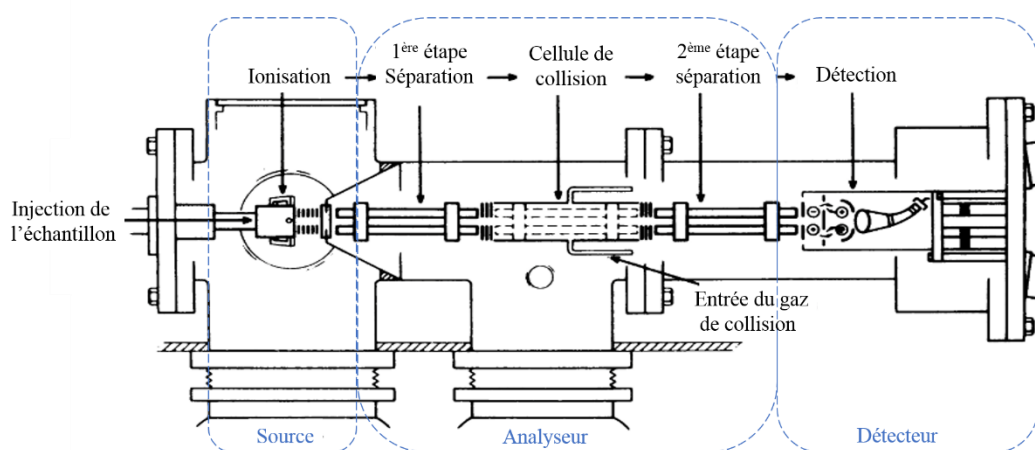


Figure I-16 – Schéma des différentes parties d'un spectromètre de masse en tandem. Adapté de McLafferty, (1981)

### 3.1.2 Couplage HPLC - fractionnement – détection d'activité :

L'analyse des extraits en utilisant l'HPLC couplée à différents détecteurs permet de caractériser les molécules présentes mais ne donne pas d'informations sur les molécules actives. Pour identifier ces molécules, un fractionnement peut être nécessaire. Il s'agit de collecter les composés à la sortie du détecteur au lieu de les éliminer (**figure I-15**).

Cette collecte peut s'effectuer en utilisant une HPLC analytique ou préparative. En HPLC analytique, les diamètres internes des colonnes sont petits, des débits de phase mobile de l'ordre du millilitre au maximum sont utilisés et la quantité d'échantillon injectée sur la colonne est faible (quelques milligrammes au maximum). Elle permet de collecter directement les fractions de petits volumes en plaques 96 puits et de réaliser les tests directement après fractionnement. Dans l'étude d'Adams *et al.* (2009), des extraits de plantes et de champignons ont été analysés en HPLC puis les fractions ont été collectées en plaque 96 puits, le solvant a été évaporé et les

fractions ont été directement utilisées pour réaliser des tests antiparasitaires. Ce couplage séparation – test biologique permet d’accélérer l’identification des molécules porteuses de l’activité. Les masses de fractions obtenues avec une HPLC analytique sont faibles (de l’ordre du microgramme), ce qui peut s’avérer insuffisant pour l’identification de certaines molécules ou pour effectuer des tests complémentaires permettant de caractériser l’activité (détermination de la concentration inhibitrice 50 (IC<sub>50</sub>) ou test de cytotoxicité par exemple).

L’HPLC préparative utilise des colonnes de plus grands diamètres internes permettant d’injecter une masse d’échantillon plus importante (plusieurs dizaines de milligrammes) et d’obtenir de plus grandes quantités de fractions. Elle peut donc être utilisée pour effectuer un fractionnement bio-guidé dans le but d’isoler ou de purifier un ou plusieurs composés d’intérêt.

Les différentes techniques séparatives présentées couplées à un fractionnement permettent d’identifier les molécules responsables de l’activité recherchée dans des matrices complexes. Les rendements d’extraction et de purification de certaines molécules naturelles sont parfois faibles, il peut donc être intéressant pour la production à grande échelle de certaines de ces molécules d’utiliser la culture végétale *in vitro*.

### **3.2 Production de métabolites spécialisés grâce à la culture végétale *in vitro* :**

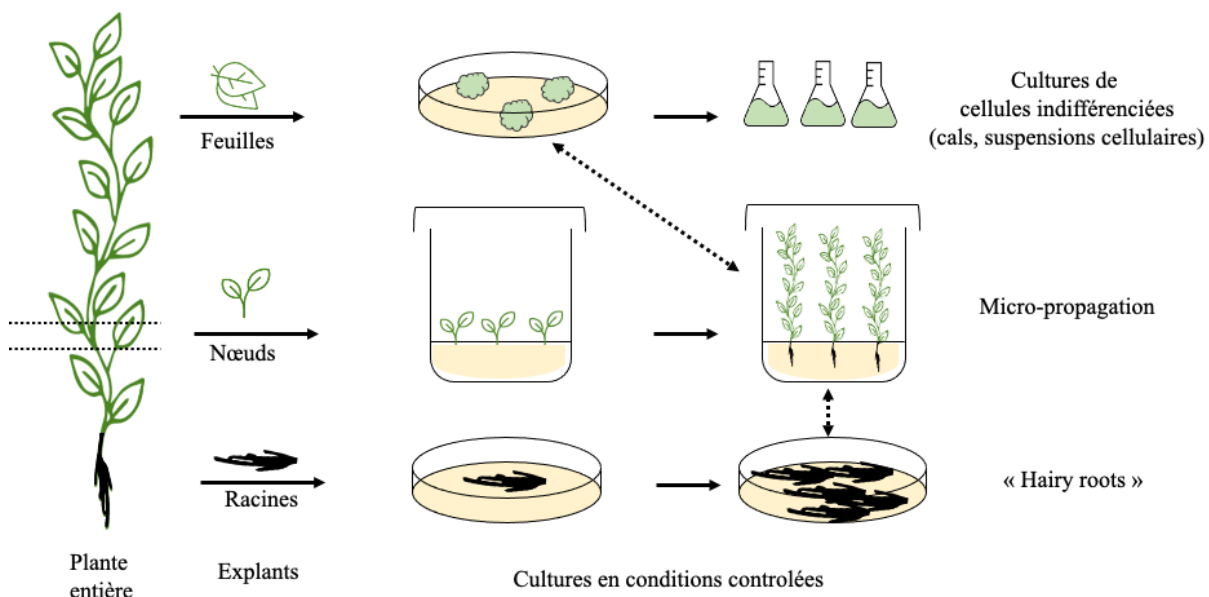
#### **3.2.1 Principe/ avantages :**

Comme vu auparavant dans ce chapitre, les plantes sont des êtres vivants sessiles qui produisent des métabolites secondaires indépendamment du métabolisme de base de la plante. Ces métabolites spécialisés sont synthétisés en réponse à un stress et peuvent être différents d’une espèce à une autre mais également entre plantes d’une même espèce à cause de facteurs génétiques ou ontogéniques (suite d’évènements subis par un organisme).

Cette production est également dépendante de différents facteurs environnementaux qui peuvent être biotiques ou abiotiques. Les facteurs biotiques sont constitués par les êtres vivants qui entrent en interaction avec la plante que ce soit des micro-organismes (champignons, bactéries, virus) ou des animaux (insectes, herbivores). Les facteurs abiotiques, quant à eux sont issus de l’environnement non vivant. Ce sont des variations de température, de salinité, de luminosité, d’humidité, de teneur en composés chimiques (fertilisants, hormones, éléments traces métalliques) (Verma et Shukla, 2015). En raison de tous ces paramètres, le profil phytochimique des plantes d’une espèce donnée peut varier en fonction des saisons, du climat, de l’emplacement géographique, de l’individu sélectionné et rend donc difficile l’obtention de résultats homogènes. La culture végétale *in vitro* (CVIV) permet de lisser ces variations.

En effet, lors de la culture *in vitro* de plantes, ces dernières vont se développer en conditions contrôlées ce qui signifie qu’elles auront le même environnement donc les mêmes stress biotiques et abiotiques et donc des profils phytochimiques proches.

La culture *in vitro* permet à partir d'explants (parties de la plante) ou de graines de régénérer une plante entière, ou d'obtenir des cultures de cellules indifférenciées ou d'organes spécialisés (par exemple culture de chevelus racinaires aussi appelé hairy roots), en utilisant des milieux de culture contenant différents mélanges d'hormones végétales (**figure I-17**).



**Figure I-17 – Schéma des différentes étapes permettant d'obtenir des cultures de cellules indifférenciées, des plantules (micropropagation) ou des chevelus racinaires « hairy roots »**

Les cultures de cellules indifférenciées sont issues majoritairement d'explants foliaires et permettent d'obtenir après quelques semaines de culture sur un milieu solide des cals (amas de cellules indifférenciées). Ces cals peuvent ensuite être mis dans un milieu liquide sous agitation et vont former une suspension cellulaire. Ces types de cultures peuvent être placées à la lumière ou à l'obscurité et peuvent être utilisées pour la production à grande échelle de métabolites d'intérêt grâce à des bioréacteurs, comme le paclitaxel qui est une molécule anticancéreuse (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

La micro-propagation permet à partir de peu de matière végétale (en général de nœuds) de régénérer et de multiplier des plantes qui peuvent ensuite être acclimatées en terre puis être plantées en serre ou en champs. Elle permet de multiplier des plantes menacées d'extinction comme par exemple l'*Impatiens repens* qui est une plante médicinale au Sri Lanka (Herath et Wijesundara, 2010).

La culture des chevelus racinaires est un peu différente car elle utilise une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, qui provoque la formation de hairy roots au site de blessure lorsqu'elle infecte une plante. En effet, la bactérie va transférer une partie de ses plasmides dans les cellules végétales ce qui va induire la formation de racines. Cet effet de l'infection peut être reproduit *in vitro* avec des cocultures plantes/bactéries tout en éliminant ensuite les bactéries, pour obtenir un tapis racinaire qui va pouvoir être utilisé pour la production de métabolites

secondaires, à petite ou à grande échelle (jusqu'à plusieurs litres de culture dans des bioréacteurs) (Pistelli *et al.*, 2010). La scopolamine est par exemple produite de cette façon par une entreprise japonaise (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). La culture de chevelus racinaires peut également permettre de régénérer des plantes entières (Pistelli *et al.*, 2010).

La culture hydroponique est une méthode qui permet de produire des métabolites d'intérêt et qui peut également être considérée comme de la culture *in vitro*, les plantes n'étant pas cultivée en terre mais dans un substrat liquide nutritif dans lequel baigne les racines. Ce liquide permet l'extraction des exsudats racinaires. Il peut ensuite être déchargé des molécules d'intérêt qu'il contient en passant sur une colonne contenant du charbon actif ou un autre adsorbant. Le liquide « frais » obtenu est ensuite remis au contact des racines et une nouvelle extraction est possible. Ce système permet une collecte des exsudats racinaires en continu. Les molécules piégées sur la colonne sont ensuite récupérées et testées avec les différentes méthodes vues précédemment (De Albuquerque *et al.*, 2011).

### 3.2.2 Hormones utilisées en culture végétale *in vitro* :

Les hormones utilisées en culture végétale *in vitro* sont de différentes natures : auxines, cytokines, gibbérellines ou acide abscissique et ont chacune une fonction particulière.

Les auxines, déjà présentées dans la partie 1.2.3.3, peuvent être soit produites par la plante au niveau de l'apex de la tige soit obtenues de manière synthétique. Elles sont principalement impliquées dans les mécanismes d'initiation racinaire et d'élongation cellulaire. Les auxines utilisées le plus couramment en culture *in vitro* sont l'acide indole 3-butyrique (IBA) une auxine naturelle et le 2,4-D et l'ANA deux auxines synthétiques (Beyl, 2004).

Les cytokinines sont produites au niveau de l'apex racinaire et sont des dérivés de l'adénine (une base purique) ou de la phénylurée. Parmi les dérivés de l'adénine, on trouve la kinétine (KIN), la zéatine (ZEA) et la benzyladenine (BAP) (**figure I-18**). Les cytokinines sont impliquées dans le développement des rejets (nouvelles pousses qui se forment sur une plante existante), dans la division cellulaire et la différenciation (Beyl, 2004).

Les gibbérellines sont des hormones végétales dérivées du glyceraldehyde-3-phosphate et de composés diterpéniques de 19 à 20 atomes de carbone. L'acide gibbérellique 3, produit par un champignon, est une molécule à 19 atomes de carbone et est le plus utilisé en CVIV.

Les gibbérellines permettent de favoriser l'élongation des entre-nœuds et la germination (Davies, 2010).

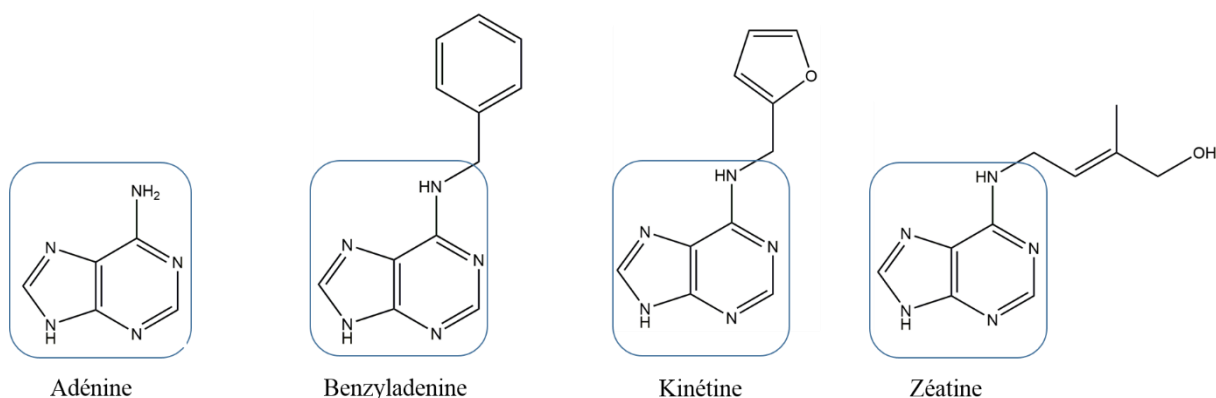


Figure I-18 – Structure des différentes cytokinines et de l'adénine.

### 3.2.3 Élicitation :

L'élicitation consiste à reproduire un stress *in vitro* pour induire la production de métabolites d'intérêt grâce à des composés appelés éliciteurs ajoutés au milieu de culture utilisé. Ces éliciteurs peuvent être biotiques c'est-à-dire d'origine biologique ou abiotiques (Naik et Al-Khayri, 2016).

Parmi les éliciteurs biotiques se trouvent les polysaccharides comme le chitosan qui est un polymère de sucres dérivé de la chitine, les extraits de levure, les dérivés fongiques (fragments de paroi) ou bactériens, qui activent les défenses des plantes en mimant une attaque (Naik et Al-Khayri, 2016).

Les éliciteurs abiotiques vont être composés de molécules qui ne sont pas d'origine biologique à savoir les éliciteurs chimiques ou physiques. Les éliciteurs chimiques sont par exemple des minéraux ou des métaux. Cai and Kastell (2013) ont utilisé de l'argent, du cadmium et du cobalt à différentes concentrations pour faire produire des dérivés de resvératrol à des suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* L. (vigne cultivée). Les éliciteurs physiques sont quant à eux la température, le stress hydrique (sécheresse), les rayonnements ultraviolets... Ces derniers ont été utilisés par exemple par Xu *et al.* (2015) pour la production de stilbènes par des suspensions de vigne cultivée.

Les hormones bien que produites par les plantes sont parfois considérées comme des éliciteurs abiotiques (Naik et Al-Khayri, 2016), ou comme une catégorie d'éliciteurs à part entière (Baenas *et al.*, 2014). Les hormones les plus utilisées sont le méthyl-jasmonate, l'acide jasmonique et l'acide salicylique.

Ces différents éliciteurs peuvent être utilisés séparément ou combinés comme cela a été réalisé par Xu *et al.* (2015) en combinant des ultra-violets et des hormones comme le méthyl-jasmonate ou l'acide salicylique.

L'élicitation peut être réalisée sur différents types de cultures pour la production de divers métabolites d'intérêt à visée thérapeutique ou non. Concernant les cultures de cellules

indifférenciées, des cals d'*Ocimum* spp (famille du basilic *Ocimum basilicum*) ont par exemple été élicités avec du méthyl-jasmonate pour augmenter leur production en acide bétulinique (triterpène) qui est un anticancéreux (Pandey *et al.*, 2015) et des suspensions d'*Hypericum perforatum* (millepertuis) ont été élicitées avec différentes molécules (méthyl-jasmonate, acide salicylique, ou sulfate de nickel) pour augmenter la production de flavonoïdes (J. Wang *et al.*, 2011). Des cultures de chevelus racinaires de l'*Impatiens balsamina* ont été élicitées avec du méthyl-jasmonate, du chitosan, mais aussi de l'extrait de levure pour augmenter la production en naphthoquinones (Sakunphueak et Panichayupakaranant, 2010). Un même éliciteur ne favorise pas forcément la production de toutes les molécules appartenant à une même famille chimique. Par exemple en appliquant du méthyl jasmonate à des cultures racinaires d'*Impatiens balsamina*, Sakunphueak and Panichayupakaranant (2010) ont observé une surproduction de lawsone et de lawsone méthyl éther mais pas du méthylène-3,3'-bilawsone par exemple. Les éliciteurs peuvent aussi être ajoutés dans le milieu de culture des pousses. Le sorbitol, le chitosan, le NaCl et le KCl ont par exemple été appliqués à des cultures de digitale pourpre (*Digitalis purpurea* L.) pour augmenter la production de glucosides cardiotoniques comme la digitoxine et la digoxine (Patil *et al.*, 2013).

D'autre part, des précurseurs de la voie de biosynthèse des molécules d'intérêt peuvent être utilisés. Dans le cas des glycosides cardiotoniques, du cholestérol et de la progestérone ont été utilisés. Même si l'ajout de ces précurseurs peut permettre d'augmenter la production de métabolites d'intérêt, ils peuvent également réduire la croissance de la plante (Patil *et al.*, 2013).

#### 4. Objectifs du projet de thèse :

Ce projet de thèse intitulé « Méthodes de caractérisation innovantes pour la recherche de molécules à potentiel allélopathique » avait plusieurs objectifs. Comme discuté dans ce premier chapitre, les produits phytosanitaires utilisés depuis des décennies pour certains sont sur le déclin avec de plus en plus de retraits du marché et d'études montrant leur toxicité pour l'Homme, les espèces non-cibles mais également pour l'environnement. Ainsi, des initiatives gouvernementales se développent pour trouver des alternatives limitant leur impact sur l'environnement, dont l'utilisation de produits de biocontrôle. Les plantes et notamment les plantes invasives, ornementales vigoureuses ou adventices semblent être de bonnes sources de molécules phytotoxiques en raison de la production de composés allélopathiques leur permettant de coloniser plus de territoires.

Pour découvrir de nouvelles molécules phytotoxiques, des méthodes servant à évaluer le potentiel allélopathique des plantes ont été développées, mais celles-ci sont basées sur des protocoles très hétérogènes. Ainsi, au sein d'une même méthode comme la méthode en papier filtre, de grandes différences dans les paramètres expérimentaux sont observées ce qui rend

difficile la comparaison entre les études et la compréhension globale des propriétés allélopathiques d'une plante donnée. De nouvelles méthodes sont donc nécessaires pour identifier les plantes d'intérêt de manière rapide et standardisée. Le premier objectif de ce projet était donc de développer une méthode en plaque 96 puits permettant l'étude du potentiel allélopathique d'extraits de plantes de polarités différentes sur différentes plantes cibles (à la fois monocotylédones et dicotylédones). Pour ce faire, une molécule standard a été choisie pour optimiser les étapes du test et une plante modèle connue pour son caractère invasif dans la Région Grand Est a été utilisée en première application du test à un mélange complexe de molécules. Le développement de la méthode est rapporté dans le chapitre 2. De plus, le lien entre activité biologique et molécules actives n'avait pas été clairement établi pour cette plante modèle, une étude approfondie de son caractère phytotoxique, décrite dans le chapitre 3 de ce manuscrit, constituait le deuxième objectif de cette thèse. Elle comprenait à la fois l'étude du potentiel allélopathique des différents organes de la plante, mais également la mise en culture *in vitro* de cette plante dans le but de caractériser les molécules produites en conditions contrôlées. Le dernier objectif de ce projet était d'évaluer le potentiel phytotoxique de plantes invasives, adventices ou ornementales vigoureuses, se développant dans la Région Grand Est, grâce à la nouvelle méthode mise au point dans le but d'identifier de nouveaux candidats bioherbicides. Les résultats obtenus sont détaillés dans le chapitre 4.

---

# CHAPITRE II

---





## Chapitre II - Développement d'un test de détection de l'activité bioherbicide en plaque 96 puits

---

### 1. Introduction aux 2 tests utilisés et généralités sur la validation de la méthode :

#### 1.1 Le test en boîte de Petri sur papier filtre : mise en place et problématiques :

Dans la littérature, on peut voir que différents tests ont été mis en place par le passé pour permettre d'évaluer le potentiel phytotoxique de différentes plantes. Ils sont décrits dans le chapitre I : Introduction. Les plus communément utilisés sont le test sandwich, la méthode plant box et le test en boîte de Petri sur papier filtre. Ce dernier est particulièrement usité pour évaluer le potentiel bioherbicide d'extraits de plantes. Toutefois, des paramètres consensus ne semblent pas avoir vraiment émergés et d'importantes variations dans les conditions expérimentales sont visibles d'une étude à une autre, par exemple les volumes d'échantillons utilisés peuvent varier de 10 mL comme de 0,7 mL et le nombre de graines cibles utilisées de 10 à 100 (**tableau I-3, page 68**). Les études listées dans le **tableau I-3** ont majoritairement utilisé des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre. Une seule étude a utilisé des plaques 96 puits pour évaluer la germination de plantes parasites (Pouvreau *et al.*, 2013). Les solutions d'échantillons utilisées pour réaliser les tests antigerminatifs étaient le plus souvent des extraits de plantes réalisés avec différents solvants (eau, méthanol, éthanol), des molécules pures ou encore des métaux. Les plantes cibles utilisées étaient également diverse et comprenaient des plantes modèles comme le cresson et la laitue ou encore des plantes adventices comme l'éleusine d'Inde (*Eleusine indica* L.) utilisée dans l'étude d'Ismail *et al.* (2016). Enfin, peu d'études utilisent des contrôles positifs, on ne peut citer que celles de Palacios *et al.* (2010) et d'Alcarcon *et al.* (2014) où le 2,4-D a été utilisé.

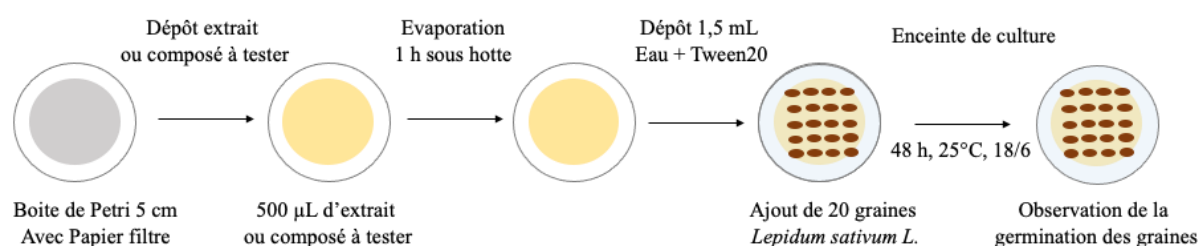
Face aux conditions expérimentales variables des études décrites dans le **tableau I-3**, qui rendent les comparaisons entre les études difficiles, **l'un des objectifs de cette thèse était de développer une méthode de mesure de l'activité bioherbicide en plaque 96 puits reproductible qui utiliserait des quantités minimales d'échantillon et de graines et qui permettrait le criblage d'un grand nombre de plantes en un minimum de temps.**

Pour ce faire, il était nécessaire d'avoir une méthode de référence utilisée dans des conditions standard afin d'obtenir des résultats initiaux auxquels comparer ceux obtenus avec la nouvelle méthode développée. Le test en boîte de Petri sur papier filtre utilisée couramment au laboratoire a été choisi comme test de référence. En effet, il s'agit d'une méthode facile à mettre en œuvre avec peu de matériel nécessaire et qui permet une évaluation rapide du potentiel bioherbicide des extraits plantes. Néanmoins, elle a quelques inconvénients notamment les

volumes importants d'échantillon nécessaires (plusieurs mL), la difficulté de bien visualiser la germination des graines et le manque d'informations sur les molécules responsables de l'activité. La nouvelle méthode développée devait conserver les points positifs de la méthode en boîte de Petri, tout en corrigeant les points négatifs. Le cresson a été choisi comme plante cible pour cette transposition car c'est une plante de petite taille, qui a une germination homogène et rapide (48h). De plus, cette plante a une forte sensibilité aux composés allélopathiques, ce qui en fait une plante cible modèle intéressante (Macías *et al.*, 2000).

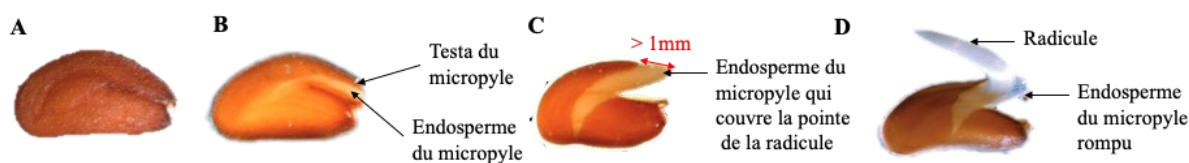
Les conditions de ce test de référence ont été établies en relation avec les informations résumées dans le **tableau I-3**. En effet, les boîtes de Petri choisies sont de 5 cm de diamètre, plus petites que les boîtes de 9 cm de diamètre généralement utilisées. Le volume d'échantillon à déposer sur le papier filtre a été adapté au diamètre de la boîte choisie et permettait d'imbiber complètement le papier filtre. De même pour le nombre de graines à déposer dans la boîte. Dans les études utilisant le cresson comme plante cible, le nombre de graines est compris entre 10 et 25 par boîtes. Ces graines ayant une petite taille, 20 ont pu être déposées sur un papier filtre de 47 mm sans qu'elles ne soient en contact les unes avec les autres.

Les différentes étapes du test ont été résumées dans la **figure II-1**. Tout d'abord, un papier filtre de 47 mm a été déposé dans une boîte de Petri de 5 cm et imbibé avec 500 µL d'extrait ou de solution à tester. Les boîtes ont ensuite été placées sous hotte pendant 1h afin de permettre au solvant de s'évaporer. Une solution d'eau contenant du Tween 20 (0,05% v/v) (1,5 mL) a été ajoutée dans la boîte de Petri. Le Tween 20 est un tensioactif qui, ajouté dans l'eau, va permettre d'augmenter la surface de contact entre le liquide et la graine et donc faciliter le contact entre les molécules herbicides et les graines. Vingt graines de cresson ont été placées dans chaque boîte, le volume d'eau par graine est donc de 75 µL. Les boîtes ont été ensuite mises dans une enceinte de culture pendant 48 h avec des conditions de température et de photopériode contrôlées (25°C, 18 h de jour et 6 h de nuit).



**Figure II-1 – Schéma du protocole utilisé pour le test de référence en boîte de Petri pour la mesure de l'activité antigerminative.**

Au bout de 48 h, les graines sont sorties des boîtes et leur germination est évaluée en fonction de la taille de la radicule (**Figure II-2**). La germination des graines de cresson se fait en plusieurs étapes avec notamment la rupture du testa (**Figure II-2-C et 2-D**) qui est la couche la plus externe de la graine. Pour évaluer la germination des graines, la taille de la radicule a été mesurée et la distance entre le testa du micropyle et la pointe de la racine a été utilisée comme mesure de référence lorsque la graine est peu germée (**Figure II-2-C**). En effet, si cette distance est supérieure à 1 mm, la graine est considérée comme germée, sinon comme non germée. Si la graine est bien germée (**Figure II-2-D**), la taille de la radicule est mesurée de sa base à sa pointe, à l'œil nu à l'aide d'une règle.



**Figure II-2 – Étapes de la germination d'une graine de cresson, Adaptée de Müller *et al.* (2006) (A) graine de cresson avant germination (B) au bout de 6 h, rupture initiale du testa du micropyle, (C) au bout de 12 h rupture avancée du testa, (D) rupture de l'endosperme du micropyle.**

### **1.2 Mise au point de la méthode en plaque 96 puits :**

La nouvelle méthode développée devait être, comme le test de référence, facile et rapide à mettre en place, mais elle devait, également permettre une visualisation facilitée de la germination des graines ainsi qu'un couplage avec une technique séparative. Disposant d'un module HPLC permettant une collecte des fractions après séparation en plaque 96 puits, la méthode développée a utilisé ce contenant avec pour objectif de disposer une graine par puits. Les différents paramètres de culture ont dû être optimisés (**figure II-3**), le contenant du test n'ayant pas les mêmes caractéristiques qu'avec la méthode en boîte de Petri.

Dans un premier temps, les graines de cresson devaient germer correctement en plaque 96 puits, c'est-à-dire de façon équivalente à ce qui était obtenu en boîtes de Petri, malgré le fait que chaque graine était à présent dans un puit de la plaque 96 puits et non plus dans une boîte de Petri. Dans la méthode en boîte, les graines étaient placées sur un papier filtre qui servait de support. Mais ce support n'était pas pratique à utiliser en microplaque, des minidisques devant être introduits dans chacun des puits. Trois conditions ont donc été testées : utilisation de l'agar comme support, utilisation du papier filtre de diamètre adapté au puits comme support et absence de support. Le volume d'eau permettant la germination des graines a aussi dû être adapté lors de l'utilisation de papier filtre ou sans support.

Dans un deuxième temps, une fois les conditions de germination optimales déterminées, des molécules phytotoxiques ont été utilisées pour mettre au point les conditions expérimentales permettant la visualisation de l'activité bioherbicide. Les molécules choisies pour le développement de la méthode étaient la lawsone qui est une naphthoquinone et le 2,4-D qui est une auxine synthétique utilisée comme herbicide. Les quantités d'échantillon à introduire dans les puits ont dû être déterminées, ainsi que les conditions d'évaporation des solvants dans lesquels les échantillons à tester ont été resolubilisés. Le volume de la solution eau + Tween 20 a dû être ajusté pour permettre à la fois aux graines de germer et aux molécules d'être correctement solubilisées.

Enfin, la méthode a été testée pour la mesure de la taille de la racine des graines de cresson en contact avec des concentrations croissantes de lawsone.

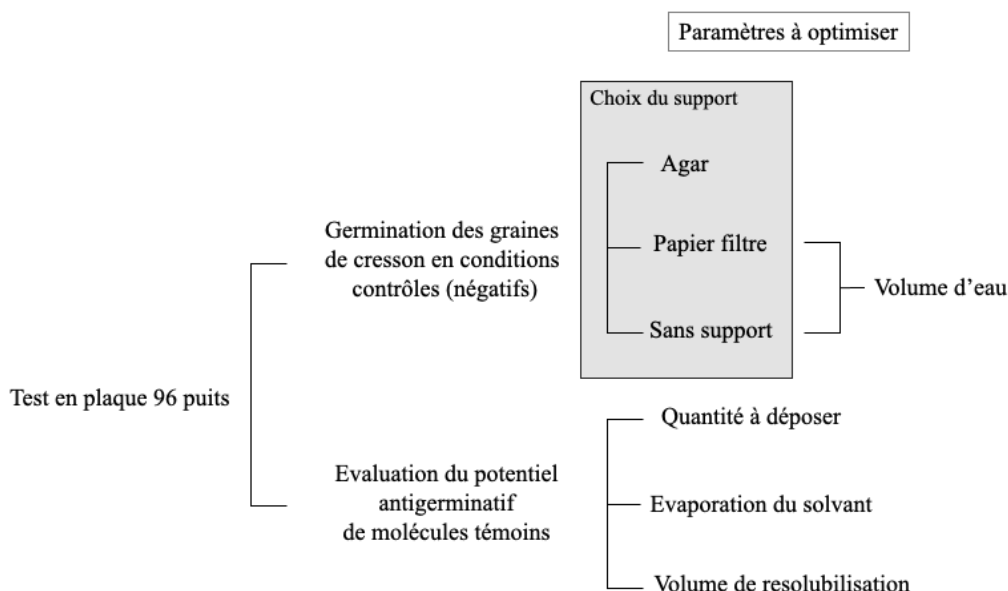


Figure II-3 – Résumé des paramètres à optimiser pour la mise en place du test en plaque 96 puits utilisant des graines de cresson comme plante cible

### 1.3 Validation de la méthode :

Après le développement et l'optimisation des différents paramètres expérimentaux, la méthode de l'activité bioherbicide en plaque 96 puits a été validée. Selon le guide de validation des méthodes d'analyse (Feinberg, 2012), la validation d'une méthode consiste à démontrer que celle-ci permet d'atteindre les objectifs techniques définis. Par exemple, lors de cette thèse, la méthode doit permettre d'évaluer rapidement le potentiel antigerminatif des extraits de plantes ou de molécules pures, tout en donnant des résultats répétables peu importe le jour de la mesure et comparables à la méthode en boîte de Petri avec papier filtre utilisée jusqu'alors. Dans le but

de valider la nouvelle méthode, différents paramètres ont été évalués. Leurs définitions sont indiquées dans le glossaire (Comité commun pour les guides en Métrologie, 2012)

Tout d'abord, la **sélectivité** (ou selectivity en anglais) de la méthode a été évaluée. La nouvelle méthode mise en place devait permettre de détecter l'impact de l'extrait ou de la molécule à tester sans interférence avec d'autres facteurs. La sélectivité a été contrôlée en évaluant le taux de germination des graines en fonction de la concentration de l'échantillon à tester par rapport aux résultats obtenus pour les contrôles sans échantillon (solvant seul).

Ensuite, la **fidélité de mesure ou fidélité** (precision en anglais) a été contrôlée. Elle est quantifiée grâce à un écart type ou des coefficients de variation et elle comprend trois niveaux : la répétabilité (repeatability en anglais), la fidélité intermédiaire (intermediate precision en anglais) et la reproductibilité. Cette dernière est utilisée lors de la normalisation d'une méthode et fait intervenir plusieurs laboratoires (Feinberg, 2012). Il serait intéressant de l'évaluer si l'utilisation de la méthode augmente. La **répétabilité** est la fidélité de la mesure selon les conditions de répétabilité qui sont définies comme suit : « la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période » (Comité commun pour les guides en Métrologie, 2012). Ainsi dans le cadre du développement du test, la répétabilité a été vérifiée en prenant en compte les répétitions réalisées le même jour et à des jours différents et a été caractérisée par un coefficient de variabilité de répétabilité ( $CV_r$ ) calculé comme suit :

$$CV_r = \frac{S_R}{\bar{x}} \times 100 = \frac{\sqrt{V_{INTRA}}}{\bar{x}} \times 100 \text{ avec } V_{INTRA} = \frac{SCE_{(INTRA)}}{N-k} = \frac{\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (x_{ij} - m_j)^2}{N-k}$$

Avec  $i$  : l'indice de la répétition dans un groupe,  $j$  : l'indice du groupe,  $n$  : le nombre de répétition dans un groupe et  $k$  : le nombre de groupes. Chaque valeur  $i$  de chaque groupe  $j$  correspond à  $x_{ij}$  et la moyenne du groupe est notée  $m_j$ .  $N$  correspond à la somme des effectifs de chaque groupe  $j$  et est calculé comme suit :  $N = n \cdot k$ . La moyenne estimée  $\bar{x}$  est la moyenne des  $m_j$ .  $SCE_{(INTRA)}$  correspond à la somme des carrés des écarts à la moyenne pour un groupe donné.

Par exemple si une expérimentation est effectuée en duplicat trois jours différents (**Tableau II-1**),  $n$  correspond au nombre total de répétition dans un groupe donné ici 2,  $i$  étant l'indice de la répétition, il sera compris entre 1 et 2.  $k$  correspond au nombre de groupes différents (ici les jours) et est égal à 3,  $j$  étant l'indice du groupe, il sera compris entre 1 et 3.  $N$  est la valeur totale des observations soit  $n \times k$ , ici  $2 \times 3$ ,  $N$  est donc égal à 6.

**Tableau II-1 – Exemple du nombre de graines germées en conditions contrôlées avec l'utilisation de 2 boîtes différentes par jour. La manipulation a été réalisée trois jours différents avec 10 graines par condition.**

	Jour 1	Jour 2	Jour 3
Répétition 1	$x_{11} = 10$	$x_{12} = 10$	$x_{13} = 9$
Répétition 2	$x_{21} = 9$	$x_{22} = 8$	$x_{23} = 9$

La **fidélité intermédiaire** est la fidélité de la mesure dans les conditions suivantes : « la même procédure de mesure, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période étendue, mais pouvant comprendre d'autres conditions que l'on fait varier qui sont de nouveaux étalonnages, étalons, opérateurs et systèmes de mesure » (Comité commun pour les guides en Métrologie, 2012). Pour le développement du test, la fidélité intermédiaire a été évaluée en comparant les résultats obtenus en réalisant les expériences 3 jours différents. Elle est exprimée grâce à un coefficient de variation de fidélité intermédiaire ( $CV_{FI}$ ) qui se calcule comme suit :

$$CV_{FI} = \frac{S_{FI}}{\bar{x}} \times 100 = \frac{\sqrt{V_{INTRA} + \frac{V_{INTER} - V_{INTRA}}{n}}}{\bar{x}} \times 100$$

$$\text{avec } V_{INTER} = \frac{SCE_{(INTER)}}{k-1} = \frac{\sum_{j=1}^k n_j (m_j - \bar{x})^2}{k-1}$$

Avec  $i$  : l'indice de la répétition dans un groupe,  $j$  : l'indice du groupe,  $n$  le nombre de répétition dans un groupe et  $k$  : le nombre de groupes. Chaque valeur  $i$  de chaque groupe  $j$  correspond à  $x_{ij}$  et la moyenne du groupe est notée  $m_j$ . La moyenne estimée  $\bar{x}$  est la moyenne des  $m_j$ .  $SCE_{(INTER)}$  correspond à la somme des carrés des écarts à la moyenne entre les groupes.

Enfin, la **justesse de la mesure** (measurement trueness en anglais) a été vérifiée. Il s'agit de l'adéquation entre la moyenne de plusieurs mesures et une valeur de référence. La valeur de référence utilisée dans le développement du test était celle obtenue dans les mêmes conditions grâce au test en boîte de Petri avec du papier filtre.

**L'ensemble de ces paramètres a été utilisé pour valider la nouvelle méthode proposée. Des tests statistiques ont été mis en œuvre afin de comparer les résultats obtenus**

**avec ceux de la méthode « classique » en boîte de Petri mais également pour comparer l'activité d'extraits de différentes parties d'une plante ou de différentes plantes.**

#### **1.4 Les tests statistiques utilisés dans les études allélopathiques et autre possibilité :**

Les tests statistiques sont souvent utilisés en biologie pour permettre de vérifier l'impact d'un ou plusieurs facteurs sur une variable donnée. Dans le cas de l'évaluation du potentiel allélopathique des plantes, le développement de graines de plantes cibles est évalué en quantifiant leur taux de germination ou en mesurant la longueur des racines ou de l'hypocotyle en fonction de la concentration en échantillon testée. Pour ce faire, différents tests statistiques sont utilisés sans harmonisation entre les études. Dans l'étude de M. S. S. Carvalho *et al.* (2019) le test de Tukey est utilisé pour évaluer l'impact d'extraits d'amaranthe sur la germination de graines d'avoine. Ce test est paramétrique et se base sur des distributions statistiques comme la loi normale et impose l'adéquation à plusieurs conditions. En revanche, dans l'étude de Lorenzo *et al.* (2016) le test de Kruskal-Wallis, un test non paramétrique (sans adéquation avec la loi normale), est appliqué pour évaluer l'impact de fractions d'extraits d'acacia sur la germination de graines de laitue. Enfin dans l'étude de Pouvreau *et al.* (2013) une transformation mathématique ( $\arcsin()$ ) des taux de germination permet d'appliquer les tests statistiques nécessitant le suivi d'une loi normale pour évaluer l'impact d'exsudats racinaires sur la germination de plantes parasites.

La germination des graines est une observation binaire : graine germée ou non qui ne suit pas une distribution normale. Des études se sont donc intéressées au traitement de ces données sans transformation des pourcentages de germination et en prenant en compte le caractère binomial des observations, grâce au **modèle linéaire généralisé (GLM)** qui se base sur le modèle linéaire général. Ce dernier peut être ajusté en fonction de la distribution correspondant au mieux aux données acquises et se définit par :

$$E(y) = a_1x_1 + a_2x_2 + b + \varepsilon$$

Avec  $E(y)$  étant l'espérance de la variable ou sa moyenne attendue,  $a$  et  $b$  sont des coefficients propres à l'analyse et  $\varepsilon$  est l'erreur sur la mesure.

A partir de ce modèle linéaire général il est possible de faire une transformation des données d'origine afin de les faire correspondre à une distribution donnée grâce à une fonction de lien qui va varier en fonction de la distribution choisie. C'est le **modèle linéaire généralisé** qui est défini par :



$$f(E(y)) = a_1x_1 + a_2x_2 + b + \varepsilon \text{ avec } f() \text{ étant la fonction de lien}$$

La fonction de lien est dépendante de la loi de distribution suivie par les valeurs considérées, par exemple pour la loi normale  $f(y) = y$  alors que pour la loi de Poisson  $f(y) = \log(y)$ .

Dans le cas rencontré dans cette thèse, la distribution des valeurs suit une loi binomiale. La fonction de lien correspondante pour utiliser le modèle linéaire généralisé est :

$$f(y) = \log\left(\frac{y}{y-1}\right) \text{ également appelée logit}$$

Cette utilisation d'une fonction de lien (logit) a été comparée à une transformation des données en utilisant la fonction arcsin (pourcentage de germination /100) dans la publication de Mora *et al* (2008) qui a évalué l'impact de la température, du stockage et du milieu de culture sur la germination de graines de *Cattleya bicolor* L. (une espèce d'orchidée provenant du Brésil). En comparant les deux approches les auteurs avaient remarqué qu'avec la transformation, l'effet du milieu utilisé et du stockage était inexistant alors que dans la littérature un effet avait déjà été décrit. En revanche, avec le GLM, tous les paramètres testés avaient un effet sur la germination que ce soit le stockage, la température ou même le milieu utilisé. Ainsi, en utilisant un modèle non adapté pour le traitement des données de germination, des relations entre l'effet de différentes conditions expérimentales n'ont pas été identifiées.

De plus, dans l'étude de Carvalho *et al.* (2018), le pourcentage de germination des graines de *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaïer) a été étudié pour comparer la qualité des modèles « normal » et « linéaire généralisé ». Lors de la représentation graphique des données en comparaison à une droite théorique, l'utilisation de la loi binomiale et de la fonction de lien logit a été plus appropriée. De même pour l'estimation de l'intervalle de confiance sur les valeurs, lorsque le modèle normal a été utilisé, les valeurs obtenues dépassaient les 100% de germination car ce modèle est étudié pour traiter des valeurs allant de  $-\infty$  à  $+\infty$  contrairement à l'utilisation de la loi binomiale pour laquelle les valeurs sont bornées de 0 à 100 %, ce qui renforce la nécessité d'utiliser le GLM avec une loi binomiale.

Les modèles utilisés dans la plupart des études pour le traitement de données liées à la germination des graines ne semblent pas optimaux à cause du caractère binaire des observations obtenues, graine germée ou non germée. **Le modèle linéaire généralisé semble être une bonne alternative permettant d'utiliser un modèle plus adapté aux traitements de ces**

**données.** Il a donc été utilisé pour les tests statistiques mis en place dans ce manuscrit concernant la germination des graines.

## **2. Tests préliminaires :**

Les contraintes d'utilisation du nouveau support en plaque 96 puits ont donc nécessité de faire de nombreux ajustements préalables avant de pouvoir entamer le processus de validation de méthode (**figure II-3**). Ils concernent les conditions permettant de faire germer les graines en plaques 96 puits, notamment le volume d'eau nécessaire et la présence ou non d'un support (agar, comme dans le test sandwich, papier filtre comme dans le test de référence).

L'objectif du test est de mettre au point une méthode permettant de visualiser l'activité sur la germination et la croissance des radicules de molécules pures ou d'extraits. Des molécules standards (la lawsone et le 2,4-D) ont été utilisées pour permettre de développer les autres paramètres du test : quantité à déposer dans les puits, évaporation du solvant et volume de resolubilisation des molécules.

### **2.1 Impact du support sur la germination des graines de cresson :**

Dans un premier temps, la germination des graines de cresson a été évaluée en l'absence de composés phytotoxiques. Cela a permis de vérifier si les graines germaient de façon homogène dans les puits et si l'utilisation de plaque 96 puits ne provoquait pas d'effet de bords c'est-à-dire si les graines dans les lignes et colonnes les plus extérieures de la plaque avaient une germination différente de celle des graines se trouvant plus à l'intérieur de la plaque. Les trois types de supports ont ensuite été testés.

Puis, l'objectif du test étant de déterminer l'impact de molécules phytotoxiques et d'extraits sur la germination des graines de cresson, il était important de tester les solvants couramment utilisés (éthanol, eau, éthanol/H<sub>2</sub>O (60/40 (v/v)), isopropanol/H<sub>2</sub>O (50/50 (v/v)) ...) pour resolubiliser ces composés et extraits et de vérifier qu'eux-mêmes ne possédaient pas de phytotoxicité. Ces deux expériences permettaient d'établir les conditions des contrôles négatifs du test.

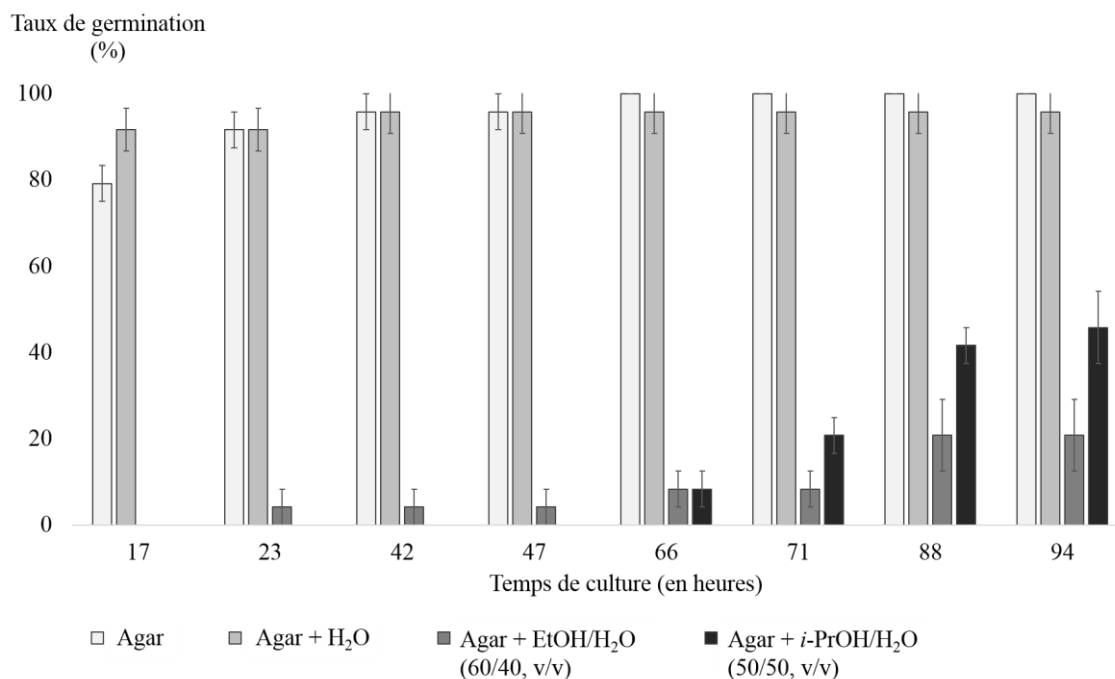
#### **2.1.1 Germination des graines avec de l'agar comme support :**

Tout d'abord, des essais de germination des graines de cresson ont été effectués en utilisant de l'agar comme support pour les graines. Cent  $\mu\text{L}$  d'agar à 1% (m/v) ont été mis dans

chaque puits, puis après solidification une graine de cresson a été déposée au-dessus. Au bout de 48 h, les graines ont été sorties des puits et leur germination a été mesurée<sup>1</sup>.

Il a été constaté que le taux de germination était de 96,8 % (une plaque 96 puits) et que celle-ci était homogène sur toute la plaque, aucun effet de bord n'a été observé.

Les graines de cresson germant bien sur de l'agar à 1% (m/v), l'incorporation d'une proportion de solvant à l'agar a été testée en vue de l'ajout des extraits à tester, resolubilisés dans un mélange isopropanol/eau 50/50 (v/v), éthanol/eau 60/40 (v/v) ou dans de l'eau. Dix µL de chaque solvant testé ont été déposés dans les puits avant d'y ajouter 90 µL d'agar à 1%. Utilisés à ce ratio, ces solvants ne doivent pas être phytotoxiques. La germination des graines de cresson a été mesurée à plusieurs heures d'intervalle (**figure II-4**). Les graines déposées sur de l'agar seul ou avec 10 µL d'eau avaient des taux de germination semblables à ceux observés précédemment (plus de 90 % de germination après 48h de culture). En revanche, en présence de solvant organique, le taux de germination était de 0% pendant plusieurs heures (jusqu'à 66 h de culture pour les puits dans lesquels de l'isopropanol à 50% avait été ajouté). Le taux de germination au bout de 94 h (soit au bout de 4 jours) était d'environ 30% pour l'éthanol à 60% et de 40% pour l'isopropanol. Ces deux solvants ajoutés au dixième dans l'agar provoquaient un retard de germination, non compatible avec la mise en place de tests antigermatifs.



**Figure II-4 – Taux de germination moyen des graines de cresson au cours du temps en fonction des différents solvants ajoutés à l'agar. (8 graines par condition, 3 réplicats).**

<sup>1</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.2.2.1

Des ratios plus faibles [solvant : agar] ont été testés en introduisant des volumes plus faibles de solvants : 2, 4 et 6  $\mu\text{L}$  ont été testés toujours avec 90  $\mu\text{L}$  d'agar à 1%. Ces ratios n'affectaient pas la croissance des graines de cresson. Néanmoins le volume de solution à tester qu'il était possible d'ajouter était trop faible pour être compatible avec le criblage envisagé et l'utilisation d'agar présente plusieurs inconvénients : solidification rapide à 1%, risque de non-diffusion des molécules à travers le réseau d'agar ou encore non-homogénéité de la couche d'agar dans les puits.

### 2.1.2 Germination des graines avec du papier filtre comme support

Dans un premier temps, la germination des graines de cresson a été vérifiée dans les plaques 96 puits contenant un papier filtre (de 6 mm de diamètre, obtenu à l'aide d'une perforatrice à partir de papier filtre Whatman) avec un volume d'eau de 100  $\mu\text{L}$  + Tween 20 (0,05%). Au bout de 48 heures de culture, les graines ont été sorties des puits (**figure II-5**) et le taux de germination a été évalué dans chacune des plaques (expérience réalisée en duplicat). Dans la première plaque, le taux de germination des graines de cresson était de 92,7% et dans la deuxième de 96,9% et aucun effet bord n'a été visualisé.

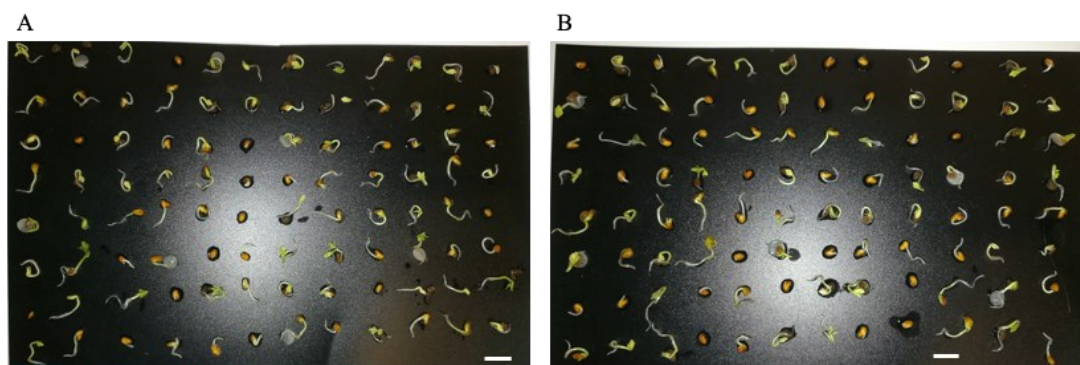


Figure II-5 – Germination des graines de cresson en plaque 96 puits avec papier filtre utilisant 100  $\mu\text{L}$  d'eau, après mise sur papier noir. Réalisée en duplicat (A-B). Le trait blanc en bas à droite représente 1 cm.

Dans l'optique de déterminer le volume d'eau à utiliser lors du test pour permettre une germination optimale des graines de cresson, des volumes de 30  $\mu\text{L}$  et 75  $\mu\text{L}$  ont été testés (dans le test en boîte de Petri, le volume d'eau + Tween 20 rapporté par graine étant de 75 $\mu\text{L}$ ). Le taux de germination des graines de cresson dans les plaques 96 puits était le même peu importe le volume d'eau utilisé :  $95 \pm 5 \%$  (2 plaques contenant chacune 20 graines).

L'impact de 2 solvants (l'éthanol et l'eau) sur la germination des graines de cresson a été évalué. Dix  $\mu\text{L}$  de chaque solvant ont été placés dans les puits de la plaque 96 puits et comme

pour la méthode en boîte de Petri, les plaques ont été laissées 1 h sous la hotte, puis 30 µL d'eau + Tween 20 ont été ajoutés. Au bout de 48 h, les taux de germination dans les puits où de l'éthanol avait été placé était de  $95 \pm 5 \%$  et ceux dans lesquels de l'eau avait été placée était de  $90 \pm 0 \%$  (20 graines et 2 réplicats).

L'utilisation de ces solvants ne semblait donc pas impacter la germination des graines après évaporation sous hotte, ce qui permet leur utilisation sans risque pour la suite du développement du test.

Le test utilisant du papier filtre permettait d'obtenir un taux de germination des graines de cresson supérieur à 90 %, ce qui était compatible avec la réalisation de tests antigerminatifs. Néanmoins, le placement de ce papier filtre dans les puits était fastidieux et la visualisation de la germination des graines de cresson n'était pas optimale, de plus, les racines blanches ne ressortaient pas bien sur le papier filtre blanc.

Il a ainsi été conclu que l'utilisation des deux supports (agar ou papier filtre) affectait négativement la mise en place du test en plaque 96 puits, la germination des graines de cresson a donc été évaluée sans support.

### 2.1.3 Germination des graines en milieu liquide sans support :

Afin de déterminer s'il était possible de s'affranchir de supports, des tests préliminaires ont été réalisés sans papier filtre et sans agar. La germination des graines a été évaluée avec différents volumes d'eau, de façon à ce que la graine soit immergée dans le puits (**tableau II-2**). Au bout de 48 h, les taux de germination des graines de cresson étaient du même ordre de grandeur peu importe le volume d'eau placé dans les puits.

**Tableau II-2 – Taux de germination moyens des graines de cresson en fonction du volume d'eau dans les puits après 48 h d'incubation (8 graines par conditions 3 réplicats).**

Volume d'eau	30 µL	40µL	50µL	60µL	70µL
Taux de germination (%)	100 (0,0)	87,5 (7,2)	95,8 (4,2)	91,7 (4,2)	100 (0,0)

Comme pour les tests avec du papier filtre, l'impact de l'éthanol et celui de l'eau sur la germination des graines de cresson ont été évalués, 10 µL de chaque solvant ont été placés dans chaque puits, les plaques ont ensuite été placées sous hotte pendant 1 h pour permettre au solvant de s'évaporer et 30 µL d'eau + Tween 20 ont été ajoutés. Les taux de germination des

graines de cresson étaient de  $97 \pm 3$  % en présence d'éthanol et de  $100 \pm 0$  % en présence d'eau. Les deux solvants ne semblaient pas avoir d'impact sur la germination des graines de cresson.

Après cette première série de tests préliminaires sur le choix du support permettant la germination des graines en conditions contrôles, l'utilisation d'agar a été écartée à cause de son aspect peu pratique et du faible volume de solvant possible à utiliser pour ajouter les échantillons sans induire de phytotoxicité due au solvant. Les expériences de germination avec ou sans papier filtre ont donné des résultats satisfaisants, avec un volume d'eau de 30  $\mu$ L et des volumes de solvants de 10  $\mu$ L après 1 h d'évaporation sous hotte malgré la difficulté de visualisation des graines germées pour les manipulations avec papier filtre. La suite de l'optimisation des paramètres de la méthode en plaque 96 puits a donc été faite en utilisant ces deux supports.

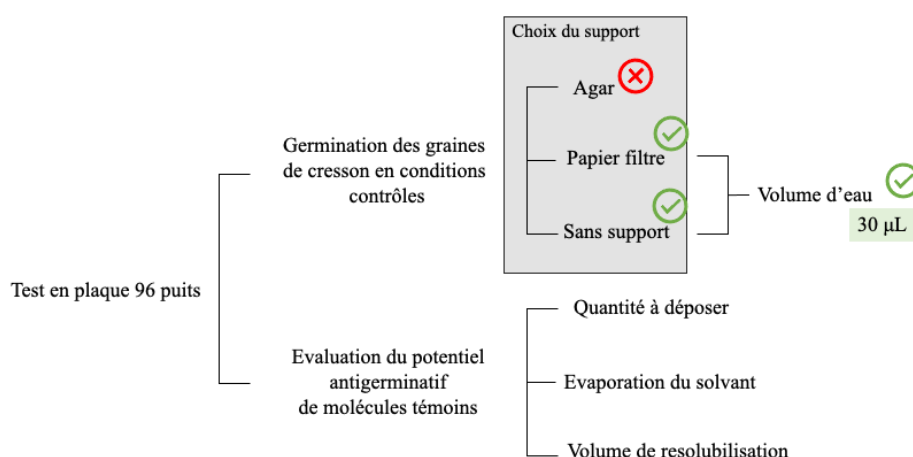


Figure II-6 – Schéma des différents paramètres à optimiser pour le développement de la méthode en plaque 96 puits

## 2.2 Évaluation du potentiel antigerminatif de molécules témoins :

### 2.2.1 Quantité de molécules à déposer :

#### 2.2.1.1 Références obtenues avec la méthode en boîte de Petri :

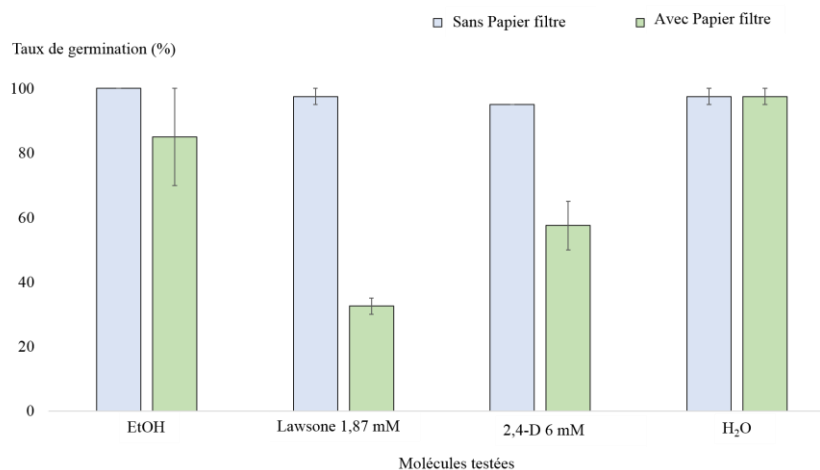
Pour déterminer les concentrations des molécules à tester, des mesures ont été faites en boîte de Petri pour obtenir des valeurs de référence de leur activité antigerminative. Des solutions mères de lawsone et de 2,4-D ont été préparées dans de l'éthanol et les concentrations finales étaient comprises entre 0,018 mmol/L et 3 mmol/L pour chacune des deux molécules. Les taux de germination pour les contrôles négatifs étaient supérieurs à 95 %. Le 2,4-D a eu un effet sur la germination des graines de cresson à partir de 3 mmol/L (avec  $56 \pm 4$  % de germination) et la lawsone a eu un effet à partir de 1,87 mmol/L avec un taux de germination de  $32 \pm 3$  %. Pour la suite des tests et pour essayer d'avoir une activité similaire des 2 molécules

(environ 30 % de germination), la lawsone a été utilisée à une concentration de 1,87 mmol/L et le 2,4-D à une concentration de 6 mmol/L.

### 2.2.1.2 Adaptation en plaque 96 puits :

Les concentrations permettant d'obtenir environ 30 % de germination étant établies, les méthodes avec et sans support papier filtre ont été comparées pour mesurer l'activité de la lawsone et du 2,4-D. Pour ce faire, des solutions de 2,4-D et de lawsone ont été préparées dans de l'éthanol. Un volume défini de solution a été déposé dans chaque puits, puis les plaques ont été laissées pendant une heure sous hotte pour permettre au solvant de s'évaporer <sup>2</sup>. Trente µL d'une solution eau + Tween 20 ont ensuite été ajoutés ainsi qu'une graine de cresson par puits. Au bout de 48 h, le taux de germination des graines a été évalué. Les résultats sont présentés dans la **figure II-7**.

Comme avec les contrôles négatifs utilisant de l'éthanol et de l'eau, les résultats obtenus avec les 2 méthodes étaient similaires au taux de germination maximal (**figure II-7**), même si une grande variabilité des taux de germination des graines pour le témoin éthanol avec du papier filtre a été observé. Pour les 2 étalons testés, un taux de germination entre 30 et 60 % a été obtenu avec papier filtre, alors que sans papier filtre le taux de germination n'est pas impacté (germination maximale), l'activité des molécules herbicides n'est pas visible.



**Figure II-7 – Taux de germination moyen des graines de cresson en fonction de la concentration en molécules testées et de la présence ou non de papier filtre dans les puits.**

<sup>2</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.2.2.2

### 2.2.2 Volume de resolubilisation :

Après avoir constaté ce résultat, l'expérience sans papier filtre a été reproduite. Il a ainsi pu être observé que lors de la phase d'évaporation du solvant sous hotte, la lawsone, particulièrement visible à cause de sa couleur jaune, remontait sur les parois du puits.

Un nouveau test a été effectué en faisant varier le volume d'eau dans les puits. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus, la même quantité de molécules à tester rapportée par graine a été déposée dans les puits des plaques 96 puits et dans les boîtes de Petri, soit 25 µg pour la lawsone et 150 µg pour le 2,4-D. Dans les boîtes de Petri, le volume d'eau utilisé est de 1500 µL (soit 75 µL par graine). Dans les plaques 96 puits, 30 et 210 µL ont été testés de façon à avoir une hauteur d'eau très différente dans les puits. Après 48 h d'incubation, le taux de germination des graines de cresson a été mesuré (**figure II-8**)<sup>3</sup>.

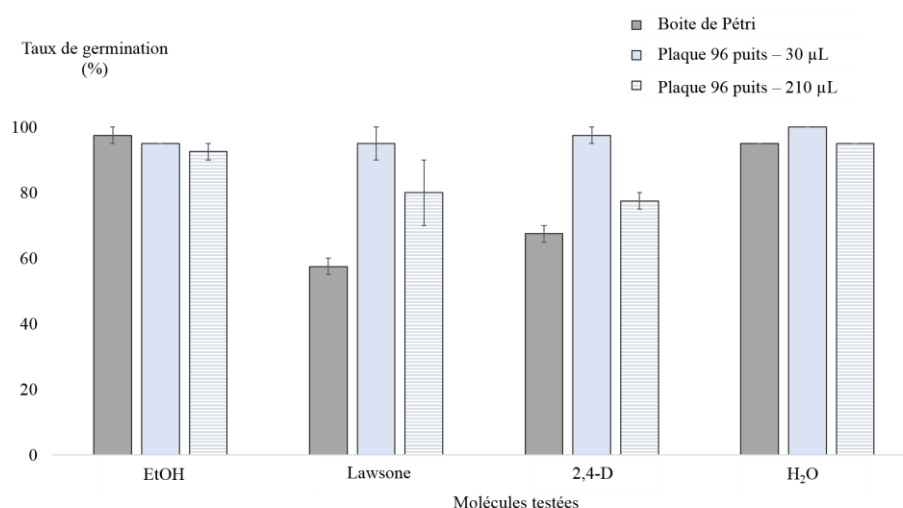
Pour les conditions contrôle, aucune différence n'était observée entre les 3 conditions : boîte de Petri, ou plaque 96 puits avec 30 µL d'eau ou 210 µL. Pour les standards, l'activité antigerminative était plus marquée lors de l'utilisation des boîtes de Petri (avec 60 % de germination environ) qu'avec les plaques 96 puits. En effet, en utilisant des plaques 96 puits contenant 30 µL d'eau, le taux de germination était identique à celui des contrôles négatifs et un début d'activité a été visualisé avec des plaques 96 puits contenant 210 µL pour la lawsone, alors que pour le 2,4-D l'activité était similaire à celle obtenue en boîte de Petri.

Il est ainsi apparu qu'en boîte de Petri, les molécules étaient piégées sur le papier filtre, ce qui permettait d'observer une plus grande activité antigerminative. En revanche, lorsque l'on transpose le test en plaque 96 puits sans papier filtre, les molécules ne sont pas retenues au fond du puits et lors de la solubilisation dans un petit volume d'eau, celui-ci ne suffit pas à récupérer toutes les molécules déposées sur les parois du puits. L'activité des molécules ne peut donc pas être visualisée. Cela a été confirmé avec l'utilisation d'un volume plus important d'eau, l'activité antigerminative était plus forte car les molécules présentes sur les parois du puits sont mieux resolubilisées

---

<sup>3</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.2.2.3





**Figure II-8 – Taux de germination des graines de cresson en fonction des molécules testées, du test et du volume d'eau utilisé.**

La méthode d'évaporation des solvants sous hotte n'était donc pas compatible à une utilisation des plaques 96 puits sans papier filtre. Des tests ont ainsi été conduits pour savoir s'il était possible de ne pas évaporer le solvant mais d'utiliser un ratio solvant : eau + Tween 20, de 1 : 10 ou de 1 : 15. Ce test n'a pas été concluant, car comme lors de l'expérience avec l'agar, la présence de solvants organiques même en faible proportion impactait le taux de germination. Cette piste a donc été écartée. Une technique d'évaporation des solvants différente a ensuite été testée.

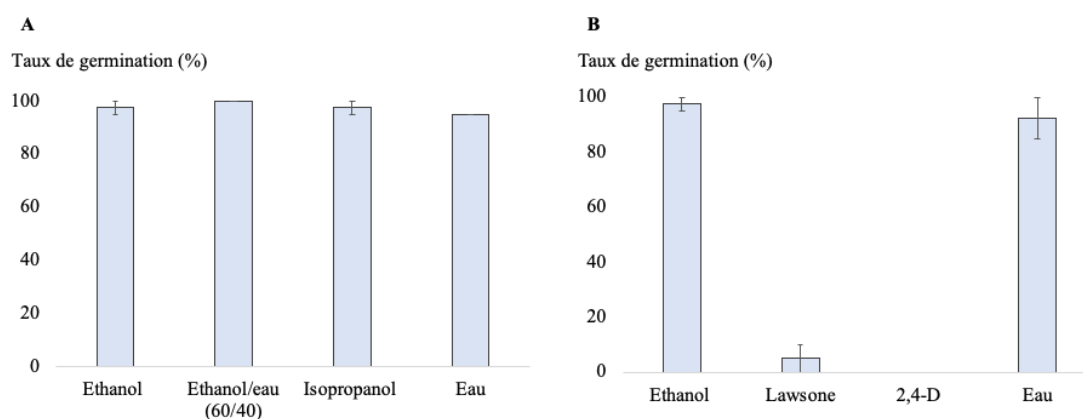
### 2.2.3 Techniques d'évaporation :

Comme indiqué précédemment, l'utilisation de solvants dès lors qu'ils sont évaporés était compatible avec les tests antigerminatifs. L'objectif était donc d'évaporer les solvants dans lequel les échantillons étaient solubilisés pour obtenir un dépôt sec au fond des puits et non sur leurs parois. Une évaporation du solvant en utilisant un évaporateur Speedvac a été testée. Cet appareil permet grâce à un système d'abaissement de la pression de diminuer la température d'évaporation des solvants, tout en appliquant un mouvement de rotation centrifuge, permettant d'obtenir des extraits secs. Ce test a permis de vérifier s'il était possible d'évaporer correctement les échantillons en obtenant des dépôts secs au fond des puits et de déterminer le temps de séchage nécessaire pour différents solvants en plaque 96 puits en un temps court (moins d'une heure).

Tout d'abord, 30 µL de solvant, correspondant à ce qu'il était prévu d'utiliser pour la resolubilisation des extraits, ont été mis dans les puits (eau, isopropanol/eau (50/50 v/v), éthanol

et éthanol/eau (60/40 v/v)). Les plaques ont été placées dans le Speedvac à 45°C pendant 18 minutes, le seul solvant totalement évaporé était l'éthanol. Au bout de 35 minutes, l'éthanol 60% et l'isopropanol 50 % étaient majoritairement évaporés. Finalement, 20 µL de chaque solvant ont été déposés ce qui permettait d'obtenir des dépôts secs au bout de 30 minutes à 40°C.

Un test a été réalisé sur la germination des graines de cresson après évaporation du solvant et ajout de 60 µL d'eau + Tween 20. Les graines de cresson avaient un taux de germination de presque 100 % après évaporation des différents solvants (**figure II-9 (A)**). Des solutions de lawsone et de 2,4-D sont déposées dans chaque puits <sup>4</sup>. Au bout de 30 minutes à 35°C, les solvants étaient évaporés et de la poudre blanche (2,4-D) ou jaune (lawsone) était visible au fond des puits, signe que les composés étaient bien présents à cet endroit. Soixante µL d'eau + Tween 20 ont été ajoutés et au bout de 48 h, les résultats ont été observés avec comme témoin négatif de l'éthanol et de l'eau. Les graines au contact des solvants seuls avaient des taux de germination d'environ 100% alors que les graines en contact avec le 2,4-D ne germaient pas du tout et très peu avec la lawsone (entre 5 et 7 % de germination) (**figure II-9 (B)**). Les taux de germination étaient plus faibles dans ces conditions qu'en boîte de Petri (Figure 9), cela pouvait être dû au volume d'eau par graine plus faible (60 µL comparé à 75 µL précédemment en boîte) ou à la concentration dans le puits qui était plus importante que celle dans la boîte de Petri (0,41 mg/mL contre 0,16 mg/mL). Même si les concentrations par graine étaient théoriquement les mêmes, dans la boîte les graines ne sont pas isolées les unes des autres, les concentrations de molécules actives n'étaient pas forcément réparties de la même façon dans toute la boîte de Petri.



**Figure II-9 – Taux de germination des graines de cresson en fonction des solvants utilisés (A) et des molécules testées (B). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne pour 2 réplicats**

<sup>4</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.2.2.4

La méthode d'évaporation et les volumes d'échantillons étant adaptés à la visualisation de l'activité antigerminative, les tests préliminaires étaient achevés.

L'utilisation de molécules témoins a permis d'optimiser les conditions expérimentales du test, en particulier quant à l'évaporation des solvants qui se fait grâce à un évaporateur Speedvac, compatible avec un volume de resolubilisation fixé à 60µL. Le résumé des paramètres optimisés est présenté dans la **figure II-10**.

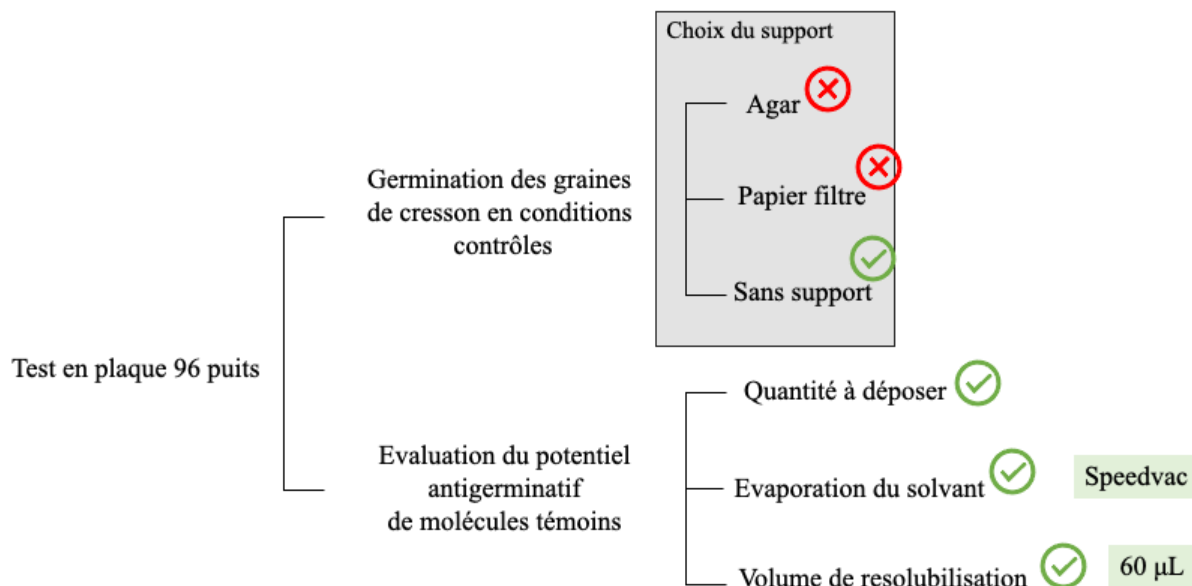


Figure II-10 – Bilan des paramètres choisis pour la mise au point du test en plaque 96 puits.

### 2.3 Mesure de la germination des graines de cresson :

Pour évaluer le taux de germination des graines de cresson, il a fallu mesurer la taille des radicules. Une graine était considérée germée quand la taille de la radicule était supérieure à 1 mm. Lors de l'utilisation des boîtes de Petri, les radicules étaient enchevêtrées dans les boîtes et la visualisation de la germination était complexe. Les graines étaient donc placées sur une feuille de papier noir pour avoir un bon contraste avec la radicule blanche des graines de cresson (**figure II-11**). La taille des radicules était ensuite mesurée à l'œil nu à l'aide d'une règle. Il se révélait parfois difficile d'avoir une mesure précise de la taille des radicules pour les graines très peu germées. De plus, les mesures devaient être faites directement au bout des 48 h d'incubation dans la chambre de culture.

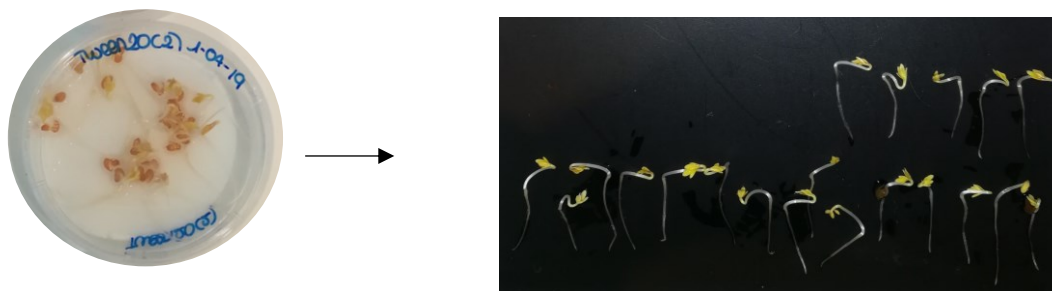


Figure II-11 – Graines de cresson germant en conditions contrôles dans une boîte de Petri (A) et une fois déposées sur un papier noir (B).

En utilisant la méthode en plaque 96 puits, avec une graine par puits, la visualisation a été facilitée. A l'aide d'un appareil photo monté sur un microscope, il a été possible de prendre en photo les graines directement dans les puits sans les sortir (sauf s'il était impossible de voir la radicule de la graine). Par exemple, sur la **figure II-12 (A)** il est possible de distinguer parfaitement que les 3 premières graines sont germées alors que pour la quatrième un doute était possible. Le logiciel ImageJ<sup>5</sup> a alors été utilisé pour mesurer avec précision la taille de la radicule (**figure II-12 (B)**). Dans ce cas la radicule (longueur visualisée par un trait rouge) mesure 1,08 mm donc la graine a été considérée comme germée. En plus de permettre une visualisation plus facile de la germination des graines, cette technique permettait également de mesurer la germination de façon décalée, les photos prises après 48 h de culture pouvaient être traitées plus tard, permettant ainsi une certaine flexibilité du temps de manipulation.



Figure II-12 – Graines de cresson en conditions contrôles après 48h de germination (A), mesure de la radicule à l'aide d'ImageJ (B).

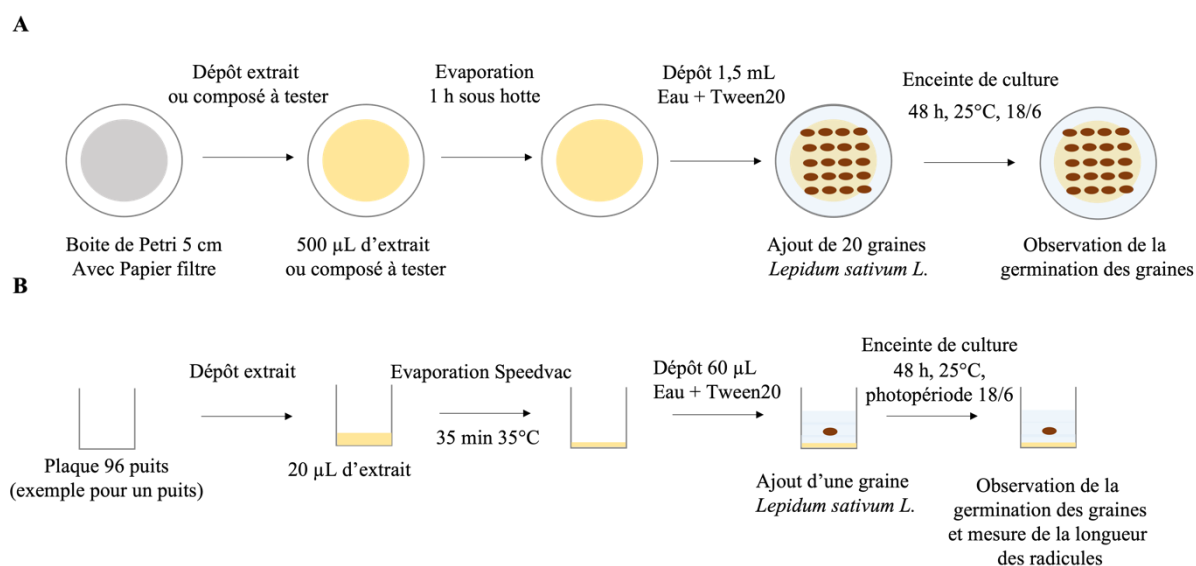
### 3. Validation de la méthode développée en plaque 96 puits :

Les différentes étapes critiques du test ayant été consolidées, une procédure de validation de la méthode a été menée à la fois pour le test initial de référence en boîte de Petri et pour la

<sup>5</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.2.2.5

nouvelle méthode en plaque 96 puits. Cette validation a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Flieller *et al.*, 2022). Le nouveau test, une fois validé, a pu être utilisé de façon systématique pour l'évaluation du potentiel antigerminatif de molécules pures ou d'extraits. Pour cela, la lawsone a été choisie comme molécule active de référence. Une même gamme de concentrations comprenant 6 points de concentration a été appliquée avec les 2 méthodes. Les concentrations ont été choisies en prenant en compte le fait que pour qu'une activité herbicide soit considérée comme intéressante, les composés allélopathiques doivent être actifs à une concentration inférieure à 0,1 mmol/L (Dayan *et al.*, 2000). Cette gamme de concentrations permettait également d'obtenir à la fois un taux de germination maximal des graines de cresson avec les concentrations les plus faibles (de 0,01 à 0,1 mmol/L), mais également de visualiser l'inhibition totale de la germination des graines de cresson pour les concentrations les plus fortes en lawsone (de 1 à 3 mmol/L). Un même nombre initial de 20 graines a été utilisé pour la méthode en boîte de Petri et la nouvelle méthode en microplaque. Puis une optimisation du nombre de graines nécessaires pour réaliser le test a été effectuée. La méthode a ensuite été appliquée à un extrait éthanolique d'*Impatiens glandulifera* Royle (IGR). Pour finir, l'activité de différentes molécules herbicides a été évaluée sur les graines de cresson et sur des graines d'autres espèces de plantes monocotylédones et dicotylédones, permettant ainsi d'évaluer la sélectivité des molécules testées. Enfin, la capacité du test à être utilisé pour la mesure de l'activité inhibitrice de la croissance racinaire a été évaluée.

Les deux méthodes utilisées sont similaires quant aux étapes définies pour le test, mais de nombreuses différences sont présentes (**figure II-13**). Tout d'abord, le contenant utilisé est différent (boîte de Petri ou plaque 96 puits), ensuite dans le premier cas, un support papier filtre est utilisé, mais pas dans le second. Pour l'étape de dépôt de l'échantillon, 500 µL ont été utilisés pour 20 graines dans le test en boîtes de Petri contre 20 µL par graine (au total 400 µL pour 20 graines) en utilisant une plaque 96 puits. L'évaporation des solvants s'effectuait sous hotte pour les boîtes de Petri et dans un évaporateur Speedvac pour les plaques. De la même façon que pour le dépôt d'échantillon, l'ajout d'eau + Tween 20 se fait avec un volume plus faible dans les plaques également avec 60 µL par graine (au total 1,2 mL pour 20 graines) contre 1,5 mL dans la boîte. Le temps de culture a été le même et la visualisation des graines s'est faite en déposant les graines sur un papier noir pour les boîtes alors que les plaques ont été prises en photo à l'aide d'un microscope. Afin d'évaluer la germination des graines, les tailles des racines ont été mesurées grâce à ImageJ dans les 2 cas.



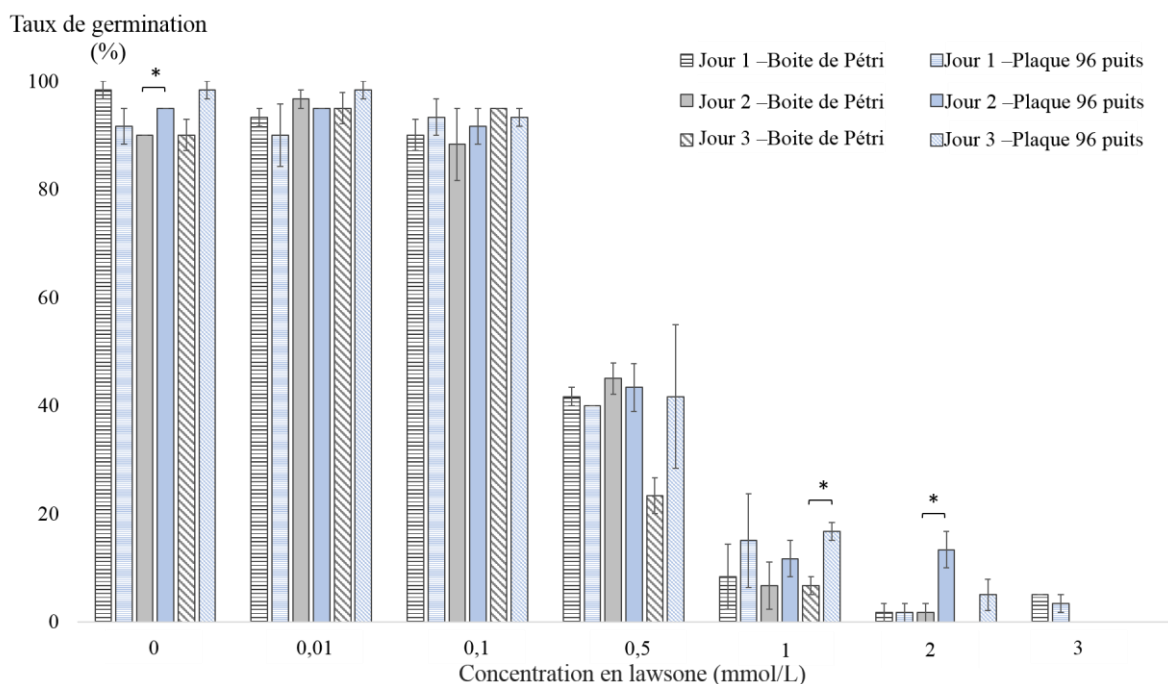
**Figure II-13 – Comparaison des différentes étapes et des conditions utilisées pour l'application de la méthode en boîte de Petri (A) et de la méthode en plaque 96 puits (B).**

### **3.1 Validation avec un standard, la lawsone :**

Dans le but de valider la méthode, les expérimentations ont été réalisées en triplicat pendant 3 jours. Cela a permis d'évaluer la sélectivité et la fidélité de la mesure des méthodes.

En premier lieu, la **sélectivité** des 2 méthodes a été déterminée. Pour cela, différentes concentrations (de 0,01 à 3 mmol/L) de lawsone ont été mises au contact des graines de cresson et leur germination a ensuite été mesurée (**figure II-14**).

Pour les 2 méthodes, les contrôles négatifs en l'absence de lawsone permettaient d'obtenir un taux de germination des graines de cresson supérieur à 90%. En ajoutant des concentrations croissantes de lawsone, une diminution de la germination des graines de cresson était observée jusqu'à une inhibition quasi-totale de la germination lorsque la concentration était supérieure à 1 mmol/L. La réduction du taux de germination des graines de cresson était donc bien due à la présence de lawsone. Les valeurs des taux de germination étaient du même ordre de grandeur pour les différents réplicats interjour et intrajour. En revanche, les taux de germination avaient des variabilités très importantes en fonction de la concentration testée et du test (en plaque ou en boîte de Petri). Pour vérifier l'acceptabilité de ces variations, la fidélité de la mesure a été calculée.



**Figure II-14 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en lawsone testée, de la méthode utilisée et du jour de l'expérimentation. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'erreur type à la moyenne pour 3 réplicats. Les \* indiquent des différences significatives entre les valeurs obtenues d'après un test de Student au seuil  $\alpha = 0,05$ .**

La **fidélité de la mesure** a ensuite été vérifiée grâce à la répétabilité (variation observée au sein des répétitions d'un même jour) et à la fidélité intermédiaire (variation observée entre les valeurs obtenues à des jours différents). Les coefficients de variation de répétabilité  $CV_r$  et de fidélité intermédiaire  $CV_{FI}$  ont été calculés pour les 2 méthodes (en boîte de Petri et en plaque 96 puits) et sont présentés dans le **tableau II-3**.

Les coefficients de variation de répétabilité et de fidélité intermédiaire obtenus étaient globalement similaires entre les deux méthodes à une concentration donnée. Ils étaient plus faibles aux concentrations en lawsone inférieures à 0,50 mmol/L pour les 2 méthodes et plus élevés pour les concentrations supérieures à 1 mmol/L.

Aux concentrations les plus fortes en lawsone, étant donné que le taux de germination moyen était très faible, lorsqu'une graine germait alors que la majorité des autres non, cela produisait une grande variabilité. Par exemple, pour la 3<sup>ème</sup> répétition en plaque 96 puits à 2 mmol/L, sur les 3 plaques, les taux de germination étaient de 0% pour l'une des plaques (pas de graine germée), de 5% pour la deuxième (une graine germée) et de 10% pour la troisième (2 graines germées). La moyenne du taux de germination était de  $5 \pm 5\%$  et le coefficient de variation était élevé, alors que la différence n'était que d'une graine germée.

Pour une concentration de 0,5 mmol/L en lawsone, des coefficients de variation entre 12,86 et 33,7 % ont été obtenus. Ceci peut être expliqué par le fait que cette concentration permet à environ 50% des graines de germer, mais qu'elle n'est ni suffisamment élevée pour empêcher complètement la germination ni suffisamment faible pour permettre à toutes les graines de germer. La germination d'une graine est un phénomène complexe qui dépend de sa sensibilité au composé phytotoxique testé, ce qui induit davantage de variations pour cette concentration intermédiaire. Par exemple, en boîte de Petri où le phénomène était le plus marqué, on pouvait obtenir pour 3 boîtes traitées le même jour, 20% de germination dans 2 boîtes et 30% dans la troisième ce qui donnait un taux de germination moyen de  $23,3\% \pm 5,7\%$ . Entre les jours, des différences entre les taux de germination ont été observées allant de 45 % pour le jour 1 à 23,3% pour le jour 3.

**Tableau II-3 – Coefficients de variabilité de répétabilité  $CV_r$  et de fidélité intermédiaire  $CV_{FI}$  en fonction de la méthode et de la concentration de lawsone utilisée.**

Concentration en lawsone (mmol/L)		0	0,01	0,1	0,5	1	2	3
Boîte de Petri	$CV_r$	3,59	3,92	7,97	12,86	105,75	212,13	0
	$CV_{FI}$	5,96	3,92	7,97	33,51	105,75	212,13	173,21
Plaque 96 puits	$CV_r$	3,92	6,36	5,39	33,7	65,27	70,71	150
	$CV_{FI}$	4,75	6,83	5,39	33,7	65,27	107,04	212,13

Enfin, la **justesse de la mesure** obtenue avec la méthode en plaque 96 puits a été calculée en comparant les taux de germination à ceux obtenus en boîte de Petri grâce à un test de Student permettant de comparer une valeur test à une valeur de référence. Seules 3 valeurs de la nouvelle méthode étaient statistiquement différentes, pour le jour 2 à 0 et 2 mmol/L et pour le jour 3 à 1 mmol/L (**figure II-14**). La différence à 0 mmol/L et 1 mmol/L était due à des faibles variabilités sur les taux de germination, mais les valeurs restaient du même ordre de grandeur que pour les autres répétitions effectuées. La différence observée à 2 mmol/L, était la seule observée pour cette concentration et peut être expliquée par une germination plus forte des graines. Les graines utilisées pour chaque réplicat étant des organismes vivants uniques, il était parfois possible d'avoir une différence dans la réponse aux composés testés mais également pour une concentration donnée. Les autres valeurs obtenues pour les différentes concentrations de lawsone étaient similaires entre les 2 méthodes, aucune valeur aberrante n'a été obtenue. Ces



légères différences observées ont été considérées comme négligeables pour la suite de l'optimisation de la méthode et ses applications.

Le processus de validation de méthode appliqué au nouveau test a permis de montrer que celui-ci était bien sélectif (effet sur la germination induit par la présence de la molécule active). La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont pu être déterminées. Bien que de forts CV aient été obtenus, pour les concentrations auxquelles une activité antigermative élevée était visible, les moyennes des taux de germination étaient comparables entre les deux méthodes, ce qui a été démontré par le calcul de la justesse. La nouvelle méthode était donc tout à fait appropriée pour effectuer des mesures d'inhibition de la germination. Dans ces conditions d'utilisation, cette méthode présentait déjà des avantages : une meilleure visualisation de la germination des graines ; un volume et une quantité d'échantillon nécessaires plus faibles par rapport à ceux utilisés en boîte de Petri (passant d'1,5 mL à 1,2 mL) pour un nombre de 20 graines par condition en triplicat. Dans l'optique d'optimiser davantage ce test, une expérience de réduction du nombre de graines a été menée.

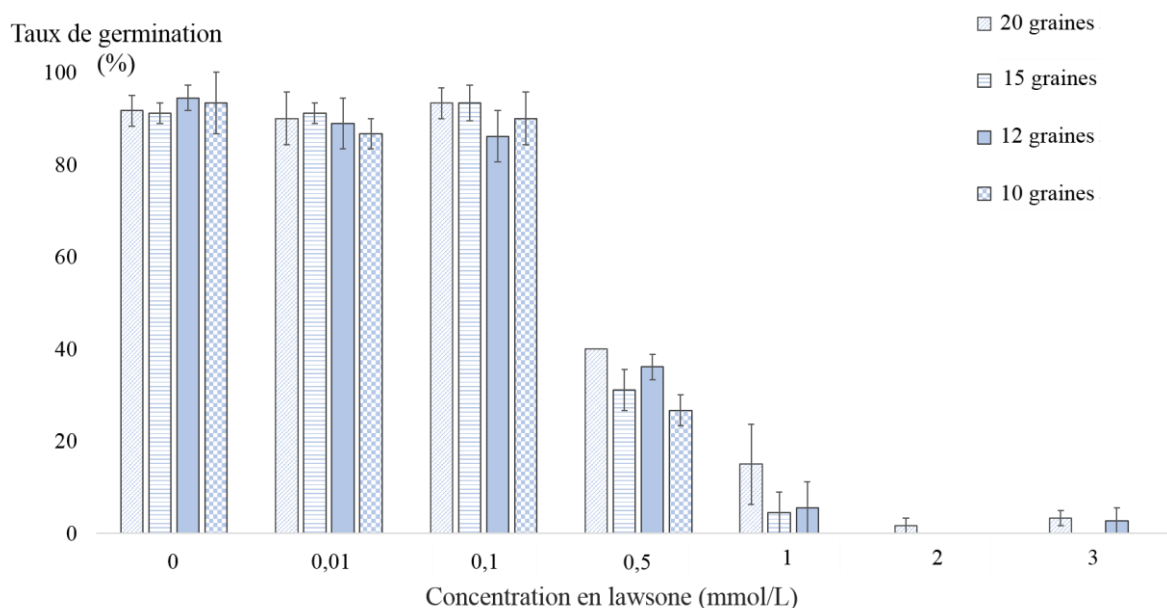
### **3.2 Réduction du nombre de graines :**

L'objectif du développement de cette méthode était d'optimiser au mieux les ressources nécessaires, en particulier le nombre de graines utilisées. Dans la littérature, l'utilisation de tests en boîte de Petri sur papier filtre fait état d'un nombre de graines de cresson variable allant de 10 graines dans l'étude de Jurová *et al.* (2019) portant sur l'activité d'huiles essentielles d'*Impatiens parviflora* à 25 graines dans l'étude de Hódi *et al.* (2012) portant sur l'activité d'extraits d'espèces d'*Oxalis*.

L'objectif de cette expérience était de tester des nombres de graines inférieurs à 20, de mesurer le taux de germination et de vérifier si celui-ci était toujours comparable à celui obtenu avec 20 graines. Pour cela, une modélisation informatique a été utilisée. Grâce aux données obtenues précédemment, un système de tirage au sort a été mise en place. Le logiciel tirait au sort 10 fois 15 graines, 12 graines, 10 graines ou 5 graines pour chaque concentration. Pour chaque nombre de graines, le taux de germination a été calculé et comparé aux résultats obtenus avec 20 graines. Plus le nombre de graines diminuait, plus le nombre de taux de germination aberrants augmentait (8 valeurs aberrantes sur 60 tirages au sort pour 5 graines, 3 pour 10 graines, 1 pour 12 graines et aucune pour 15 graines utilisées). Ce tirage au sort informatisé a permis d'éliminer le nombre de 5 graines par conditions.

Les autres valeurs ont été testées expérimentalement en triplicat avec une concentration croissante de lawsone et les taux de germination ont été mesurés (**figure II-15**). Les résultats ont été comparés statistiquement grâce à un test ANOVA. Les taux de germination obtenus pour les 4 nombres de graines testés étaient similaires pour chaque concentration. De plus, la sélectivité de la méthode était conservée avec un taux de germination diminuant quand la concentration de lawsone augmentait.

Pour optimiser la nouvelle méthode, un nombre de 10 graines par condition pouvait donc être suffisant. Néanmoins pour la suite de l'étude, un nombre de 12 graines a été choisi, permettant facilement de tester 8 conditions différentes sur une plaque 96 puits (une condition par ligne de 12 puits) et d'utiliser la plaque dans son ensemble, tout en ayant une marge par rapport au plus faible nombre de graines acceptable. Cette diminution du nombre de graines nécessaires par condition permettait également une réduction importante du volume d'échantillon à utiliser, passant de 1,2 mL pour 20 graines à 0,72 mL pour 12 graines en triplicat. L'optimisation de la nouvelle méthode était ainsi achevée.



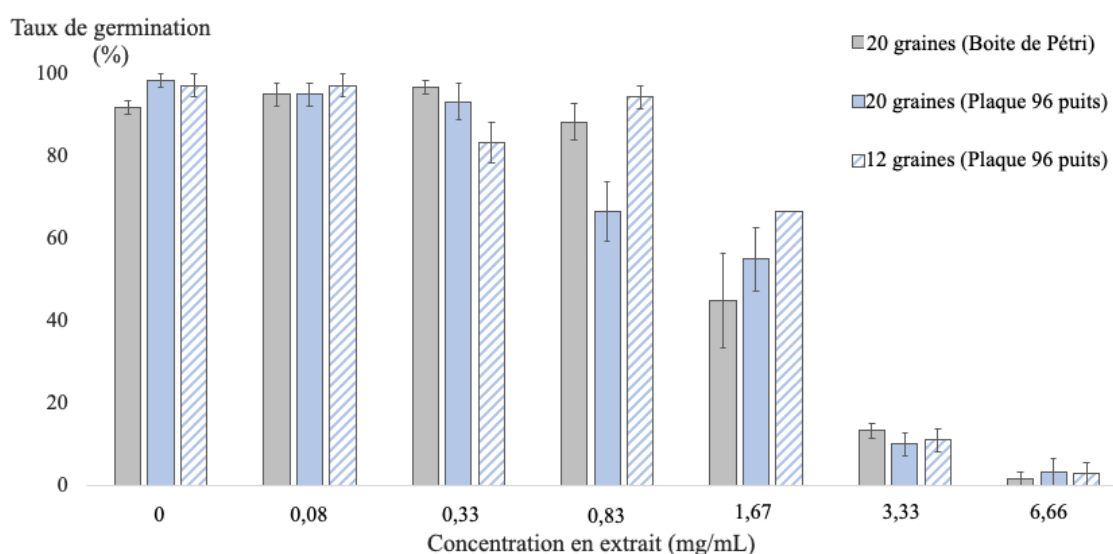
**Figure II-15 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en lawsone et du nombre de graines utilisées par condition. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne pour 3 réplicats**

Afin de mettre en application le test et d'évaluer sa capacité à obtenir des résultats représentatifs de différents échantillons, celui-ci a été appliqué à un extrait éthanolique d'IGR et à différentes molécules herbicides connues, avant d'utiliser d'autres plantes cibles que le cresson.

### 3.3 Application du test à un extrait de plante :

Après avoir été validée en utilisant la lawsone, la méthode développée a été utilisée pour évaluer le potentiel antigerminatif d'un extrait éthanolique d'IGR <sup>6</sup>, ce qui a constitué une première application sur un mélange complexe. Pour cela, la méthode la plus optimisée en plaque 96 puits avec 12 graines a été utilisée et les résultats ont été comparés à ceux obtenus en plaque 96 puits (20 graines) et en boîte de Petri (20 graines). Les expériences ont été réalisées en triplicat sur un seul jour. La gamme de concentrations en extrait comprenait 6 points et permettait d'obtenir un taux de germination maximal avec les faibles concentrations en extrait (de 0,08 mg/mL à 0,83 mg/mL) et minimal avec les concentrations en extraits les plus élevées (3,33 mg/mL et 6,66 mg/mL).

Concernant la **sélectivité**, comme pour la lawsone, aucune activité sur la germination n'était observée en absence d'extrait. En revanche, lorsque la concentration en extrait augmentait le taux de germination des graines de cresson diminuait, ce qui a prouvé le lien extrait/activité (**figure II- 16**)



**Figure II-16 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en extrait éthanolique d'IGR et de la méthode utilisée avec 20 ou 12 graines par condition. Les taux de germination sont exprimés en moyenne ± erreur type de la moyenne de 3 réplicats.**

<sup>6</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.3.2.1

La **répétabilité** a aussi été évaluée comme précédemment pour la lawsone (**tableau II-4**). La fidélité intermédiaire n'a pas été calculée ici, les expérimentations n'ayant été réalisées que sur une journée.

Les coefficients de variations de répétabilité étaient compris entre 2 et 20 % pour les concentrations en extrait inférieures à 1,67 mg/mL. Pour les concentrations en extrait plus fortes comme pour la lawsone, les coefficients de variation étaient plus importants.

Les coefficients de variation étaient inférieurs à 10% pour la méthode en plaque 96 puits utilisant 12 graines par condition pour les concentrations allant jusqu'à 1,67 mg/mL contrairement aux deux autres conditions pour lesquelles ils pouvaient dépasser 30% pour certains points de concentration. La variabilité était plus forte pour les hautes concentrations en utilisant 12 graines que 20 graines, mais les moyennes des taux de germination sont restées proches. En effet le taux de germination est d'environ 12% pour une concentration de 3,33 mg/mL d'extrait et 2% pour une concentration de 6,67 mg/mL pour les 2 méthodes.

Cette grande variabilité n'était donc pas dérangeante pour l'utilisation de la méthode dans le cadre de l'évaluation de l'activité antigermative d'extraits de plantes.

**Tableau II-4 – Taux de germination (%) des graines de cresson exprimé comme la moyenne (erreur type de la moyenne) des 3 réplicats en fonction de la concentration en extrait éthanolique d'IGR et du type de test utilisé et CV<sub>r</sub> en %.**

		Concentration en extrait (mg/mL)						
		0	0,08	0,33	0,83	1,67	3,33	6,67
Boîte de Petri (20 graines)	Taux de germination	91,82 (1,60)	95,00 (2,89)	93,33 (1,68)	88,33 (4,42)	55,00 (11,56)	10,00 (1,68)	3,33 (1,68)
	CV <sub>r</sub>	3,02	5,26	3,11	8,65	36,37	29,00	87,90
Plaque 96 puits (20 graines)	Taux de germination	98,33 (1,68)	95,00 (2,89)	96,67 (4,42)	66,67 (7,27)	45,00 (7,64)	13,33 (2,89)	1,67 (3,33)
	CV <sub>r</sub>	2,94	5,26	7,90	18,87	29,38	37,50	345,50
Plaque 96 puits (12 graines)	Taux de germination	97,22 (2,78)	97,22 (2,78)	83,33 (4,82)	94,44 (2,78)	66,67 (0,00)	11,11 (2,78)	2,78 (2,78)
	CV <sub>r</sub>	4,95	4,95	10,00	5,09	0,00	43,29	173,02

Enfin, la justesse de la mesure a été déterminée pour les résultats obtenus en plaque 96 puits avec 12 graines et ceux obtenus avec la méthode de référence (en boîte de Petri avec 20

graines). Aucune différence n'a été observée entre les taux de germination obtenus avec les deux méthodes et les taux de germination moyens obtenus étaient statistiquement similaires quelle que soit la concentration testée. L'activité antigerminative de l'extrait était visible à partir de 1,67 mg/mL avec un taux de germination compris entre 45,00 % et 66,67 % selon la méthode utilisée. La méthode en plaque 96 puits utilisant 12 graines permet bien d'évaluer de façon juste l'activité antigerminative d'un extrait de plante.

### **3.4 Activité antigerminative du glyphosate, du 2,4-D et de la 2-MNQ :**

La lawsone ayant été utilisée comme molécule « modèle » lors de la validation, le test a ensuite été appliqué à d'autres molécules herbicides connues : le glyphosate et le 2,4-D, ainsi qu'une deuxième naphthoquinone : la 2-MNQ. Les 6 concentrations testées étaient identiques à celles utilisées pour la validation avec la lawsone ce qui a permis de comparer l'activité de ces 4 molécules sur la germination des graines de cresson (**figure II-17**).

Le glyphosate n'a pas montré d'inhibition de la germination des graines de cresson quelle que soit la concentration testée. Dans une étude de Piotrowicz-Cieslak *et al.* (2010) des concentrations allant de 1  $\mu\text{mol/L}$  à 2 mmol/L ont été testées sur les graines de cresson et n'ont montré aucune activité. Cette observation est cohérente avec le mode d'action du glyphosate qui est un herbicide utilisé en post émergence et qui impacte la croissance des plantes plutôt que le taux de germination.

Le 2,4-D en revanche a induit une baisse du taux de germination visible à partir de 0,5 mmol/L avec 60% de graines germées. Pour les concentrations les plus élevées (2 et 3 mmol/L), la germination des graines de cresson a été totalement inhibée.

La 2-MNQ a montré une inhibition de la germination des graines de cresson lorsque sa concentration augmentait. Une activité significative a été observée à partir de 0,5 mmol/L et dès 1 mmol/L une inhibition totale de la germination des graines de cresson a été observée.

L'activité de la 2-MNQ était très proche de celle de la lawsone, les 2 naphthoquinones induisant des taux de germination équivalents pour des concentrations appliquées identiques (lettres bleues – **figure II-17**). La même courbe d'activité, sans différence significative a été obtenue pour le 2,4-D.

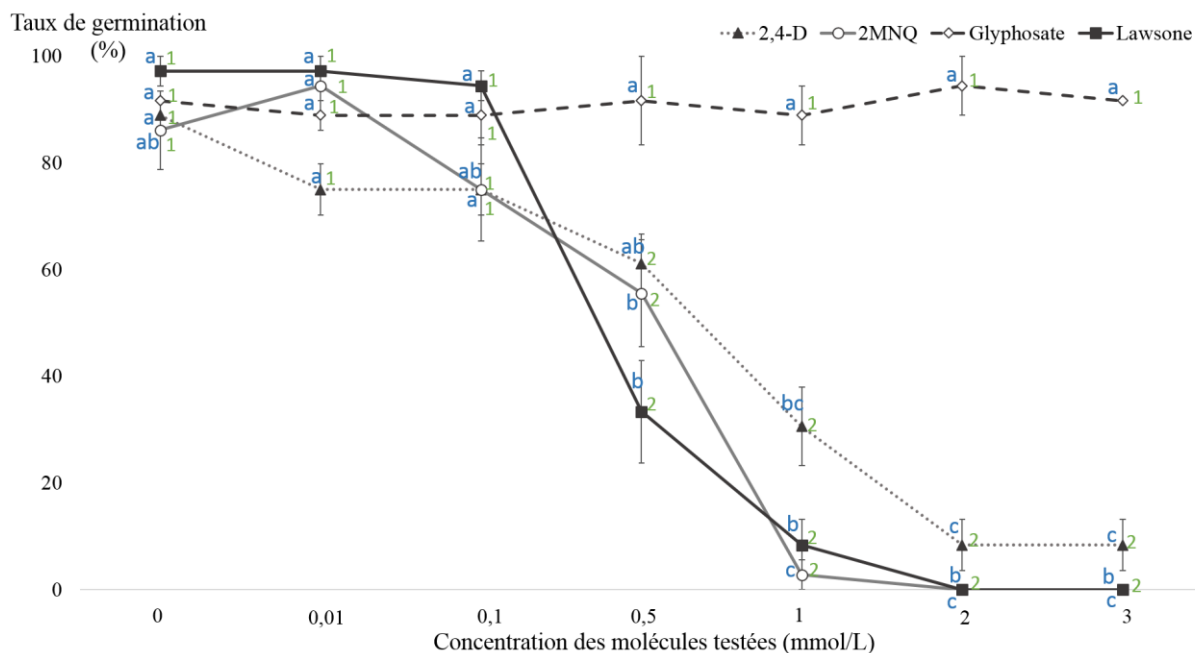


Figure II-17 – Taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en 2,4-D, 2-MNQ, glyphosate et lawsonne. Le taux de germination est exprimé comme la moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne de 3 réplicats. Les lettres en bleu indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination des graines de cresson en fonction de la concentration en molécules d'intérêt. Les chiffres en vert indiquent une différences significatives (selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination obtenus à une concentration donnée en molécule.

### 3.5 Utilisation d'autres espèces de plantes cibles :

La méthode a été développée en utilisant le cresson comme plante modèle. Dans les études évaluant le potentiel allélopathique de plantes, plusieurs plantes cibles sont en général utilisées et peuvent être des monocotylédones ou des dicotylédones et faire parties de différentes familles botaniques. Cela permet de vérifier l'activité d'un extrait ou d'un composé sur plusieurs modèles qui peuvent présenter des sensibilités différentes au même composé et ainsi de ne pas « éliminer » des molécules qui n'auraient pas d'effet sur le cresson mais qui en auraient sur d'autres plantes. Dans le cadre de cette thèse, les espèces choisies devaient avoir des graines de petite taille (quelques millimètres) pouvant être disposées dans les puits et manipulées facilement.

#### 3.5.1 Sélection des graines et conditions de culture :

##### 3.5.1.1 Les dicotylédones :

Plusieurs espèces de plantes dicotylédones ont été testées pour identifier celles qui sont les plus adaptées aux tests antigerminatifs. Ces plantes sont des espèces cultivées et

comestibles, parfois apparentées à des adventices (pourpier et pissenlit) de familles différentes, avec des graines de différentes tailles plus ou moins proches de celle du cresson (**figure II-18**). Toutes ces graines ont été achetées en jardinerie. Les conditions de culture ont été testées pour chaque plante, avec un test de germination à la lumière avec une photopériode (16/8 : jour/ nuit) ou complètement à l'obscurité, à 25°C dans une enceinte de culture <sup>7</sup>.



Figure II-18 – Graines de pourpier (1), de pissenlit (2) de laitue (3-5) variété ‘reine de mai’ (3), ‘à couper’ (4) et ‘batavia’, de cresson (6) et de radis (7). Le trait noir en bas à gauche représente 5 mm.

**Le pourpier maraîcher** (*Portulaca oleracea* L.) est une plante de la famille des Portulacaceae avec des graines de petites tailles rondes et noires (**figure II-18**). Ces dernières provenaient de 2 fournisseurs (A et B). Concernant le fournisseur A, au bout de 48 h le taux de germination des graines à la lumière était de  $77 \pm 7 \%$  et à l'obscurité de  $77 \pm 2 \%$ . Pour les graines du fournisseur B, seule la condition à la lumière a été testée et le taux de germination obtenu a été de  $97 \pm 2 \%$ .

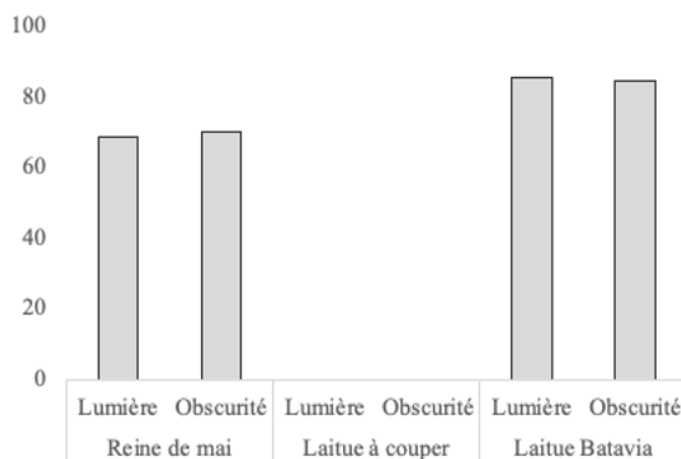
Le pourpier du fournisseur B ayant un taux de germination élevé aurait été une plante cible intéressante pour la suite des tests antigéminatifs mais sa trop petite taille (moins d'un millimètre) rendait difficile sa manipulation, ces graines n'ont donc pas été choisies pour servir de plante cible.

**Le pissenlit** (*Taraxacum* Weber ex F.H.Wigg.) est une plante de la famille des Asteraceae, qui a des graines oblongues de couleur claire. Les graines de pissenlit n'ont pas germé que ce soit à la lumière ou à l'obscurité au bout de 48 h de culture. Les graines ont été laissées 4 jours de plus dans l'enceinte de culture et le taux de germination a augmenté légèrement  $8 \pm 2 \%$  pour les deux conditions testées. Des graines ont germé que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. Le taux de germination des graines de pissenlit était trop faible dans les conditions testées pour que cette espèce soit utilisée dans les tests antigéminatifs.

<sup>7</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.3.1

**La laitue** (*Lactuca sativa* L.) est une plante de la famille des Asteraceae qui, comme le cresson de la famille des Brassicaceae, est souvent utilisée dans le cadre d'études de mesure de l'activité phytotoxique. De nombreuses variétés de laitue existent. Afin de sélectionner une variété facile à faire germer en chambre de culture et dont la germination des graines serait facile à repérer, les graines de trois d'entre elles ont été achetées : la 'reine de mai', la laitue 'à couper' et la laitue batavia 'dorée de printemps'. Bien que de taille identique, les graines de ces variétés ont des couleurs différentes : claire pour les laitues 'reine de mai' et 'dorée de printemps' et plus foncée pour la laitue 'à couper'. Deux conditions de culture ont été testées : germination à la lumière (avec une photopériode 16/8 lumière/ obscurité) ou à l'obscurité (**figure II-19**). Au bout de 48 h, des différences de germination ont été observées entre les variétés, mais chaque variété a eu le même taux de germination à la lumière et à l'obscurité. Ainsi, la laitue 'à couper' n'a pas du tout germé, cependant les deux autres laitues ont montré des taux de germination allant d'environ 70% pour la 'reine de mai' à plus de 80% pour la 'dorée de printemps'.

La laitue 'dorée de printemps' a donc été sélectionnée pour la suite des tests avec une mise en culture à la lumière.



**Figure II-19 – Taux de germination moyen (A) des différentes variétés de laitue cultivées à la lumière ou à l'obscurité pendant 48h à 25°C.**

**Le radis** (*Raphanus sativus* L.) est une plante de la famille des Brassicaceae comme le cresson, mais ses graines sont rondes et brunes (**figure II-19**). La variété choisie est la variété 'de 18 jours'. Au bout de 48 h de culture, un plus grand nombre de graines avait germé à l'obscurité qu'à la lumière, avec 75% de germination pour les graines à l'obscurité contre 44%



pour les graines à la lumière. Le radis sera donc mis à germer à l'obscurité pour les tests qui suivront.

**Les 2 espèces de plantes dicotylédones sélectionnées pour la suite des tests ont été la laitue et le radis en raison de la taille de leurs graines et de leur temps de germination court, qui les rend adaptées aux tests antigerminatifs.**

### 3.5.1.2 Les monocotylédones :

En plus des 2 espèces de dicotylédones supplémentaires choisies pour la suite des tests, des plantes monocotylédones ont été testées. Ces plantes étaient toutes de la famille des Poaceae et avaient des tailles de graines variables (**figure II-20**)<sup>8</sup>.



**Figure II-20 – Graines de millet (1), de ray grass anglais (2), de blé tendre (3) et d'avoine noire (4). Le trait noir en bas à gauche représente 5 mm.**

**Le millet commun** (*Panicum miliaceum* L.) est une céréale qui peut être cultivée pour l'alimentation animale (oiseaux) mais qui peut également être considérée comme adventices des cultures de maïs aux États-Unis et des pratiques culturales couplées à l'utilisation d'herbicides sont envisagées pour limiter son développement (Harvey et McNevin, 1990). Les graines sont de petites tailles, rondes et de couleur jaune-orangé. Le taux de germination des graines après 48 h de culture à la lumière était de  $75 \pm 0$  % et à l'obscurité de  $85 \pm 5$  %. Le millet a mieux germé à l'obscurité avec un taux de germination de 85 %, néanmoins cette espèce n'a pas été retenue pour la suite des tests car après des expériences supplémentaires, la variabilité de la germination des graines était trop grande.

**Le ray grass anglais** (*Lolium perenne* L.) est une plante herbacée fourragère et adventice dont les graines ressemblent à celles de la laitue, mais plus allongées. Le taux de germination des graines à la lumière et à l'obscurité était le même ( $7 \pm 4$  % au bout de 48 h de culture). Au bout de 6 jours de culture, les taux de germination étaient de  $58 \pm 7$  % à la lumière et de  $82 \pm 9$  % à l'obscurité. Les graines de ray grass ont mieux germées à l'obscurité qu'à la lumière au

<sup>8</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.3.1

bout de 6 jours mais leur taux de germination à 48 h n'était pas suffisant pour permettre leur utilisation comme plante cible dans la suite des tests.

**Le blé tendre** (*Triticum aestivum* L.) possède des graines plus grandes que toutes celles des dicotylédones testées (**figure II-20**). Les graines ont été cultivées à l'obscurité et à la lumière (photopériode 16/8) pendant 48 h. Au bout de 48 h de culture, les taux de germination étaient de 77% pour les graines à la lumière et de 90% pour les graines à l'obscurité. Ce résultat a permis de sélectionner les graines de blé pour les tests suivants avec une mise en culture à l'obscurité.

**L'avoine noire** (*Avena sativa* L.) est une céréale cultivée qui a des graines de couleur sombre très allongées (**figure II-20**). Après 48 h de culture, le taux de germination des graines d'avoine a été de  $28 \pm 10$  % à la lumière et de  $25 \pm 8$  % à l'obscurité. Au bout de 6 jours de culture, les taux de germination à la lumière et l'obscurité ont atteints les 70 %. Les graines d'avoine ayant un faible taux de germination dans ces conditions à 48 h (moins de 30 %) et une graine un peu trop longue pour une utilisation en plaque 96 puits, l'avoine n'a été pas retenue comme plante cible modèle pour la suite des tests.

**Seul le blé a été retenu comme graine de plante monocotylédone pour la suite des expériences.**

### **3.5.2 Impact de la lawsone sur la germination de différentes espèces de plantes :**

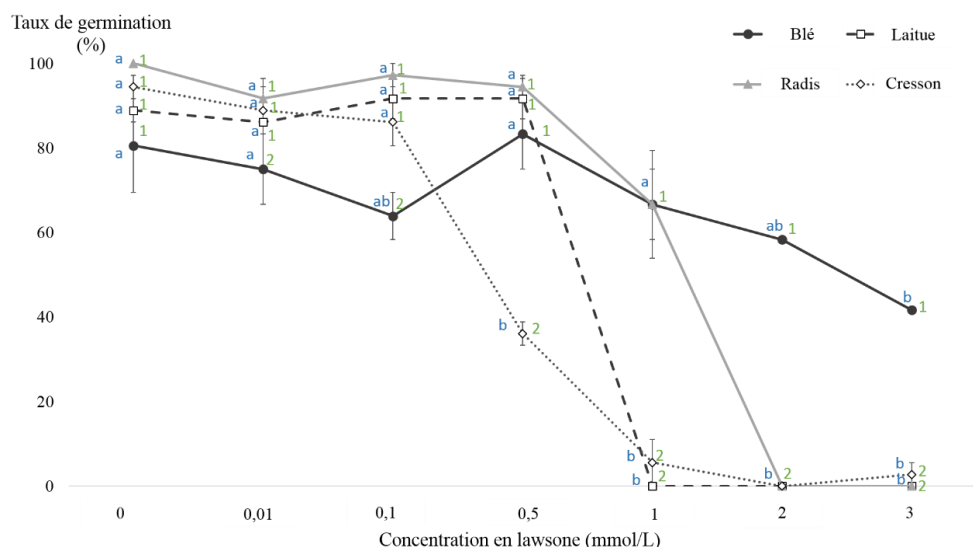
Les différentes graines sélectionnées dans le paragraphe précédent, ont été mises à germer au contact de différentes concentrations de lawsone dans les conditions de culture établies pour chacune. Au bout de 48 h de culture, les taux de germination ont été mesurés (**figure II-21**).

Le blé, seule espèce de monocotylédones utilisée dans cette étude, semble être le moins sensible à la lawsone. En effet, aucun impact sur la germination des graines de blé n'a été observé en dessous de 2 mmol/L. De plus, la variabilité du taux de germination était particulièrement élevée pour les concentrations jusqu'à 1 mmol/L. Il est donc difficile d'établir de façon claire une activité antigerminative dans ces conditions. Toutefois, à une concentration de 3 mmol/L de lawsone, le taux de germination a été réduit de 60 % montrant que la lawsone pouvait inhiber de façon significative la germination du blé, mais à des concentrations élevées.

Pour les 3 espèces de dicotylédones utilisées (la laitue, le radis et le cresson), l'activité de la lawsone était plus marquée, bien qu'aucun impact sur la germination ne soit observé en dessous de 0,5 mmol/L. Toutefois, des différences de sensibilité entre les espèces ont été visibles. Le radis était l'espèce la moins sensible des 3 dicotylédones avec une inhibition totale de la germination obtenue seulement à partir de 2 mmol/L de lawsone. L'inhibition de la germination de la laitue était visible à partir d'une concentration de 1 mmol/L et celle du cresson l'était à partir de 0,5 mmol/L, concentration pour laquelle seulement 40% des graines de cresson ont germé.

Ces résultats confirmaient ceux d'une étude de Campos *et al.* (2019) qui, en utilisant un test en boîte de Petri, ont montré que la lawsone n'avait pas d'effet sur la germination du radis et de la laitue en dessous de 0,11 mmol/L. Kocacë Aliskan et Terzi (2001) quant à eux ont testé l'activité de la juglone, une autre naphthoquinone et n'ont pas remarqué d'effet sur la germination du radis et du blé en dessous de 1 mmol/L, alors que celle du cresson était totalement inhibée à cette concentration.

Pour des concentrations identiques de lawsone, des taux de germination différents ont donc été obtenus en fonction de l'espèce de plante cible utilisée. Ces résultats suggèrent que le cresson est l'espèce la plus sensible à la lawsone, suivie de la laitue, puis du radis et enfin le blé est l'espèce la moins sensible.



**Figure II-21 – Taux de germination des graines de blé, laitue, radis, et cresson en fonction de la concentration en lawsone. Le taux de germination est exprimé comme la moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne de 3 réplicats. Les lettres en bleu indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination des graines en fonction de la concentration en lawsone. Les chiffres en vert indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination obtenus entre les 4 espèces à une concentration donnée en lawsone.**

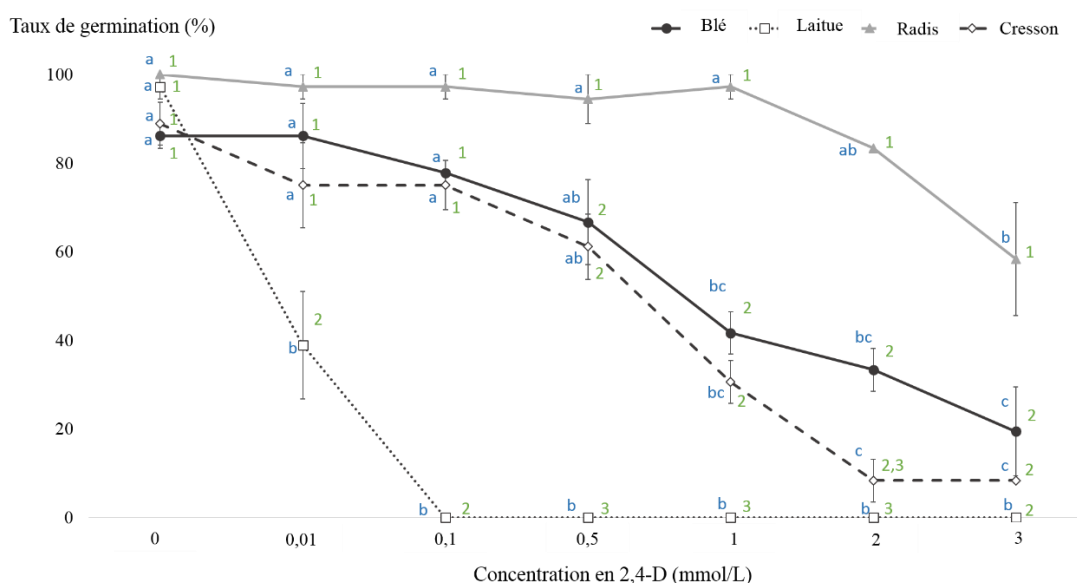
### 3.5.3 Impact du 2,4-D sur la germination de différentes espèces de plantes :

La même expérience a été réalisée en utilisant du 2,4-D comme molécule active. Pour toutes les espèces cibles testées, une diminution de la germination des graines a été observée avec l'augmentation de la concentration en 2,4-D (**figure II-22**).

Le blé avait cette fois-ci une sensibilité intermédiaire avec une inhibition de la germination des graines à partir d'une concentration de 1 mmol/L de 2,4-D. Toutefois, même à la concentration la plus élevée (3 mmol/L), la germination des graines de blé n'était pas totalement inhibée avec un taux de germination toujours de 20 %.

Les espèces de dicotylédones ont montré quant à elles des sensibilités différentes au 2,4-D. En effet, la germination des graines de radis n'a été inhibée de façon significative qu'à 3 mmol/L avec un taux de germination de 60%. Le cresson était plus sensible car une inhibition de la germination a été visible à partir de 1 mmol/L avec seulement 40% des graines germées. La laitue quant à elle était la plus sensible à l'action du 2,4-D, puisque dès 0,01 mmol/L le taux de germination a chuté à 40 % et à 0,1 mmol/L l'inhibition de la germination était totale.

La plante la plus sensible au 2,4-D était donc la laitue, suivie du cresson et du blé qui avaient une sensibilité équivalente et enfin du radis.



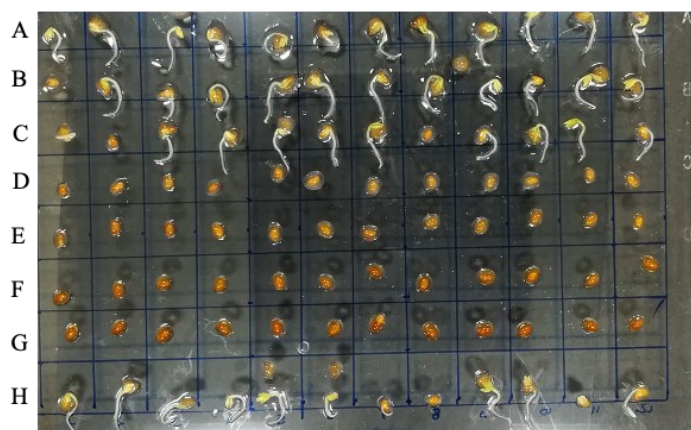
**Figure II-22 – Taux de germination des graines de blé, laitue, radis, et cresson en fonction de la concentration en 2,4-D. Le taux de germination est exprimé comme la moyenne ± erreur type de la moyenne de 3 réplicats. Les lettres en bleu indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$  %) entre les taux de germination des graines d'une espèce en fonction de la concentration en 2,4-D. Les chiffres en vert indiquent une différence significative (selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ ) entre les taux de germination obtenus pour les 4 espèces à une concentration donnée en 2,4-D.**

Ces expérimentations complémentaires ont permis d'appliquer la méthode à d'autres molécules herbicides et d'autres plantes cibles de façon simple et reproductible. Les graines les plus sensibles aux molécules testées sont le cresson et la laitue, des plantes très utilisées comme cibles modèles à cause de leur sensibilité aux composés allélopathiques.

### **3.6 Élongation racinaire :**

Après avoir validé cette nouvelle méthode à travers la mesure de l'activité antigerminative, une autre évaluation de l'activité bioherbicide a été menée en utilisant cette méthode et ce en mesurant l'inhibition de la croissance racinaire. A cet effet, la longueur des racicules des graines de cresson utilisées pour déterminer l'activité antigerminative, a été mesurée afin de voir s'il était possible d'évaluer également l'effet sur la croissance racinaire. Les données obtenues étaient complémentaires à celles sur l'activité antigerminative et augmentaient les possibilités de détecter des molécules bioherbicides.

Pour ce faire, un test un été mené en utilisant les mêmes concentrations de lawsone que précédemment (de 0,01 à 3 mmol/L) en triplicat pendant 3 jours. Pour mesurer la longueur des racicules, après 48 h de culture, les graines ont été placées dans une boîte de Petri carrée et photographiées, puis le logiciel ImageJ a été utilisé pour obtenir une mesure précise (**figure II-23**).



**Figure II-23 – Germination des graines de cresson au contact de concentrations croissantes de lawsone (A) : témoin négatif éthanol, (B) 0,01 mmol/L, (C) 0,1 mmol/L, (D) 0,5 mmol/L, (E) 1 mmol/L, (F) 2 mmol/L, (G) 3 mmol/L, (H) contrôle de germination sans solvant.**

La longueur moyenne des racicules pour les contrôles négatifs était de 6 mm et aucune différence n'a été observée entre les moyennes obtenues pour les répétitions intra-jour ou inter-jours, la longueur des racines pouvant varier de 0,6 à 13 mm (**figure II-24**). Concernant l'activité de la lawsone, la longueur de la racicule diminuait lorsque la concentration en lawsone

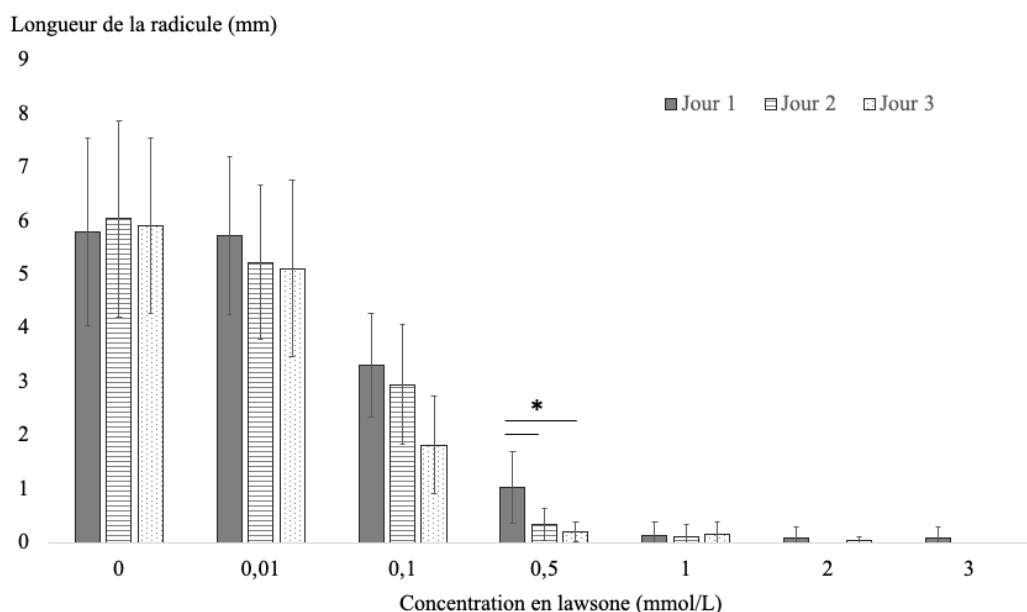
augmentait ce qui a permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice de l'élongation racinaire de ce composé, en plus de son activité antigerminative.

Concernant la répétabilité (entre plaques du même jour), 3 différences ont été observées pour le jour 1 : entre la plaque 2 et 3 à la concentration de 0,1 mmol/L, entre la plaque 1 et 2 pour 0,5 mmol/L et pour le jour 3 entre les plaques 1 et 3 pour le point à 0,1 mmol/L.

Concernant la fidélité intermédiaire (entre jours), les seules différences observées étaient pour une concentration de lawsone de 0,5 mmol/L, les résultats obtenus pour le jour 1 étaient différents de ceux obtenus pour les jours 2 et 3.

Les différences obtenues autant en fidélité intermédiaire qu'en répétabilité peuvent s'expliquer par le fait que la taille de la radicule est différente d'une graine à l'autre en fonction de sa sensibilité et de ses caractéristiques propres, une légère différence de taille peut donc conduire à de grands écarts entre les 36 graines testées sur 3 jours (**figure II-24**).

La méthode est considérée comme validée et permettant en plus du potentiel antigerminatif d'évaluer l'inhibition de la croissance racinaire des graines de cresson.



**Figure II-24 – Longueur de la radicule des graines de cresson en fonction de la concentration en lawsone testée et du jour de l'expérience. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne des 3 répétitions faites le même jour avec 12 graines par condition.**

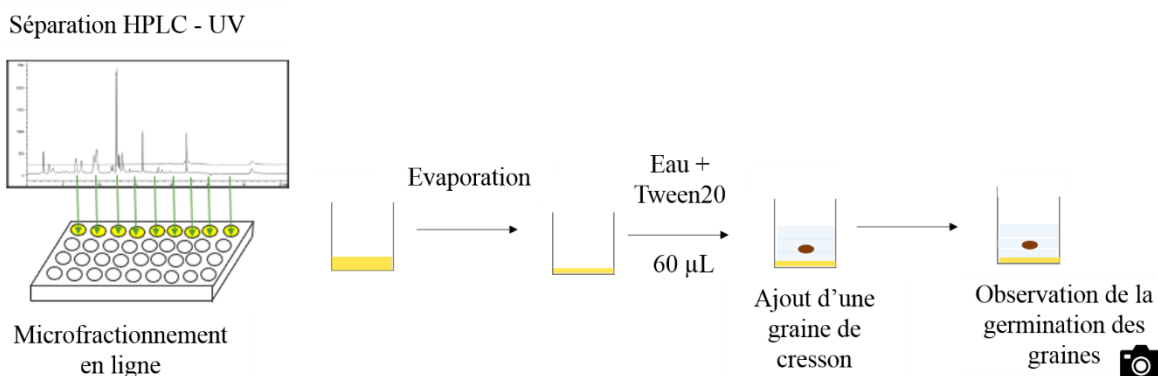
La nouvelle méthode développée a également permis en plus du taux de germination d'évaluer la croissance racinaire des graines de cresson soumises à des concentrations croissantes de lawsone. Ainsi, après avoir été validée pour la mesure de l'activité antigerminative, la méthode est également considérée comme validée pour l'évaluation de l'inhibition de la croissance racinaire des graines de cresson. Enfin, la méthode développée

permet de mettre en évidence à la fois l'activité phytotoxique de molécules pures (comme le lawson, le 2,4-D) sur différentes espèces de plantes cibles, mais également de mélanges complexes de molécules comme un extrait éthanolique de balsamine. Le test étant développé en plaque 96 puits, un couplage avec la chromatographie a été mis en place pour permettre l'identification des molécules responsables de l'activité dans un extrait complexe.

#### 4. Couplage avec l'HPLC :

L'inconvénient majeur des méthodes utilisées couramment pour la détection de la phytotoxicité est l'absence d'indication sur la nature des composés porteurs d'activité. En réalisant un couplage séparation chromatographique - test antigerminatif, les composés actifs peuvent être identifiés. Le développement de la méthode en plaque 96 puits a rendu ce couplage possible. Pour développer ce couplage, l'extrait éthanolique d'IGR ayant montré son activité bioherbicide a été analysé en HPLC, puis un microfractionnement a été réalisé en collectant les fractions directement dans une plaque 96 puits. Cette même plaque a été utilisée pour la mise en place du test antigerminatif comme précédemment après une étape d'évaporation des solvants (phase mobile) (**figure II-25**). Ce couplage permet en peu de temps, quelques heures pour la séparation chromatographique et l'évaporation du solvant puis 48 h de culture, d'avoir une indication sur la nature des composés responsables de l'activité observée et leur nombre, sans réaliser de fractionnement bioguidé classique qui peut être long à mettre en place.

Le but de ce couplage a été d'abord de permettre une première visualisation des composés actifs ou *a minima* de connaître leur temps de rétention et d'obtenir une première idée de leur polarité même si les fractions n'étaient pas pures.



**Figure II-25 – Schéma des différentes étapes nécessaires au couplage séparation chromatographique – test biologique.**

Différents paramètres ont dû être optimisés pour le développement de ce couplage. Pour la séparation chromatographique, le débit et le gradient de la phase mobile utilisée, ainsi que la quantité d'extrait injectée ont dû être définis, de même que le volume des fractions collectées et donc l'intervalle de collecte. Pour la réalisation des tests d'activité, les conditions d'évaporation de la phase mobile ont dû être déterminées et le nombre de répétitions défini (figure II-26).

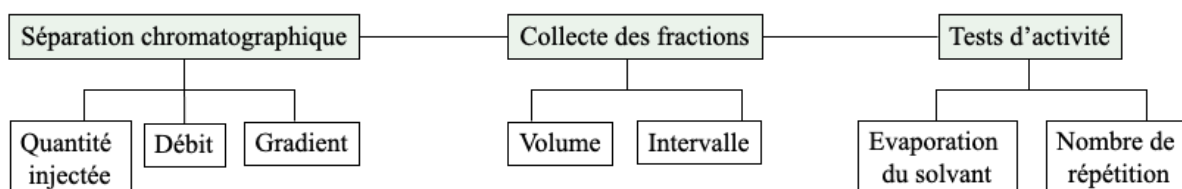


Figure II-26 – Paramètres à définir pour la mise en place du couplage séparation chromatographique - détection de l'activité bioherbicide

#### 4.1 Séparation chromatographique :

Tout d'abord une mise au point de la séparation chromatographique a été réalisée pour l'extrait éthanolique de balsamine<sup>9</sup> en utilisant une colonne Nucleodur Sphinx C18 (150 x 3 mm, 3µm) et un gradient de phase mobile (eau + acide formique (0,1% v/v) / acétonitrile) à un débit de 0,3 mL/min. Cette colonne a été choisie pour la nature de sa phase stationnaire, mais aussi ses dimensions avec un diamètre interne et une taille de particules, permettant d'utiliser un débit réduit à 0,3 mL/min tout en obtenant une bonne qualité de séparation. Le débit ne devait pas être trop élevé car le volume des puits des plaques utilisées pouvait contenir au maximum 300 µL. Le gradient développé a permis d'obtenir la séparation présentée dans la figure II-27 pour une durée totale d'analyse de 37 minutes, reconditionnement compris.

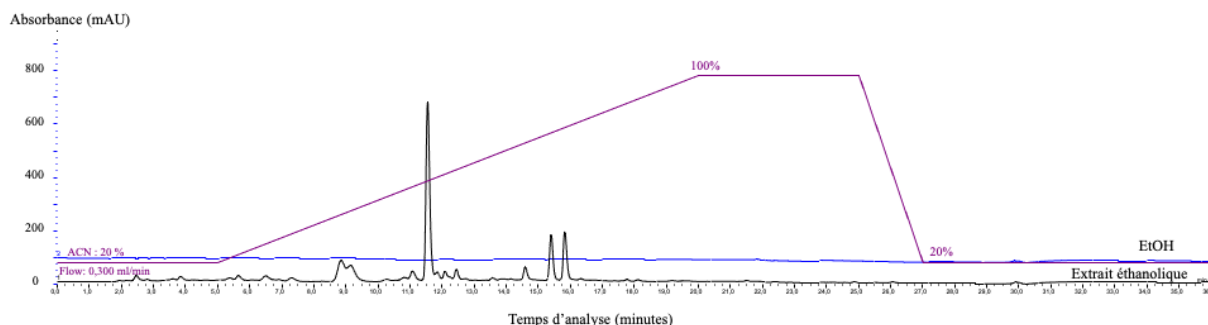


Figure II-27 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR (en noir), blanc éthanol (en bleu) par HPLC-DAD et gradient d'éluion utilisé en violet (gradient 1)

<sup>9</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI - partie 1.3.2.1



La quantité à injecter pour la collecte des fractions a été déterminée en prenant comme référence l'activité de la lawsone qui était visualisable à partir de 0,5 mmol/L correspondant à une concentration de 0,087 mg/mL. Après évaporation de la phase mobile, les fractions collectées ont été resolubilisées dans 60  $\mu$ L d'eau + Tween 20, ce qui correspond à une masse de lawsone de 0,0052 mg, soit une concentration de 0,087 mg/mL, permettant ainsi la visualisation d'une activité équivalente à celle de la lawsone. Plusieurs considérations et approximations ont ensuite été faites :

- les molécules actives auraient une activité au moins équivalente à celle de la lawsone pour être des bioherbicides intéressants ;

- la masse collectée dans chaque fraction correspondrait à la masse d'extrait injectée divisée par le nombre de fractions (masse équivalente dans toutes les fractions, ce qui n'est bien entendu jamais le cas dans la réalité)

Cela conduit aux quantités d'extrait nécessaires suivantes : pour 20 fractions il faudrait injecter 104  $\mu$ g ou 208  $\mu$ g pour 40 fractions collectées. La quantité d'extrait injectée a été fixée à 400  $\mu$ g avec un volume d'injection de 20  $\mu$ L ce qui correspond à une concentration d'extrait de 20 mg/mL.

#### **4.2 Fractionnement :**

Pour la collecte des fractions, le volume des puits et le débit de phase mobile ont été pris en compte. En effet, la capacité maximale d'un puits de la plaque 96 puits utilisée est de 300  $\mu$ L. A un débit de 0,3 mL/min, l'intervalle de collecte des fractions ne devait pas dépasser 1 minute afin de collecter un volume maximal de 300  $\mu$ L par puits. Au vu de la qualité de la séparation chromatographique et de la largeur des pics, un intervalle collecte de 30 secondes a été choisi afin d'essayer d'isoler les pics les uns des autres dans les fractions. La collecte des fractions n'est pas effectuée sur la durée totale de l'analyse (37 minutes) mais uniquement sur la durée sur laquelle des pics chromatographiques sont visibles et avant l'étape de rééquilibrage de la colonne à 27 minutes.

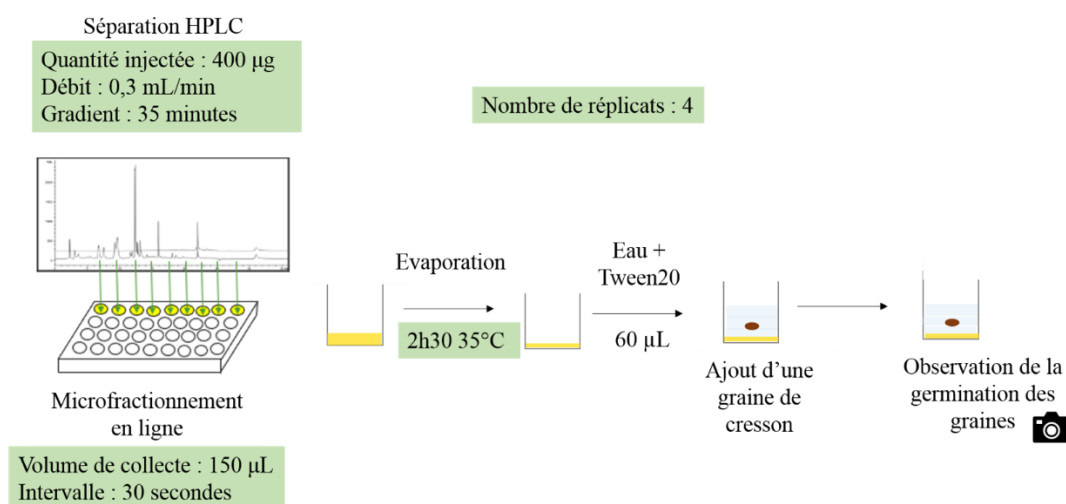
#### **4.3 Tests antigerminatifs :**

Après séparation et collecte, le solvant des fractions constitué par une composition de phase mobile variable suivant le gradient, doit être évaporé pour permettre la réalisation du test d'activité bioherbicide dans la même plaque. Ce volume de phase mobile peut-être évaporé en

quelques heures à l'évaporateur Speedvac, ce qui est compatible avec la mise en place du test. Le temps d'évaporation a été fixé à 2h30 à 35°C.

Concernant le nombre de répétitions, un nombre minimal permettant de repérer plusieurs fois les zones dans lesquelles la germination des graines était inhibée a dû être fixé. L'idéal aurait été de répéter 12 fois la collecte pour obtenir 12 puits identiques représentatifs d'une fraction. La durée de cette expérience aurait cependant été bien trop longue et fastidieuse. Il a donc été choisi dans un premier temps de réaliser 4 collectes identiques (2 collectes effectuées dans la même plaque à la suite l'une de l'autre), ce qui a permis de tester la germination de 4 graines dans les mêmes conditions et d'identifier les zones du chromatogramme correspondant à une inhibition de la germination ou de la croissance des radicules. Une fois les zones actives repérées, des analyses complémentaires pouvaient être effectuées pour aller plus loin dans l'identification des composés actifs.

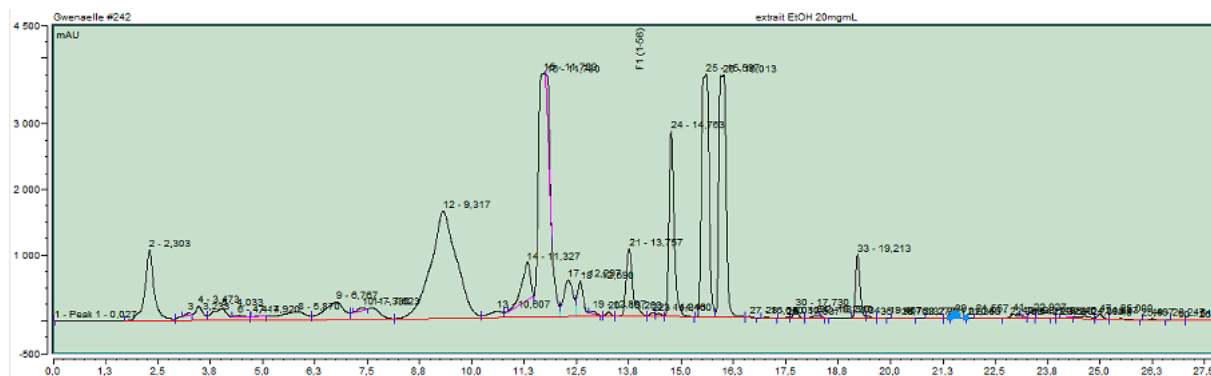
Les impératifs des tests antigerminatifs ont permis d'établir les paramètres pour la réalisation du couplage (**figure II-28**).



**Figure II-28** – Schéma des différentes étapes du couplage HPLC – tests antigerminatifs avec indiqués en vert les différents paramètres optimisés.

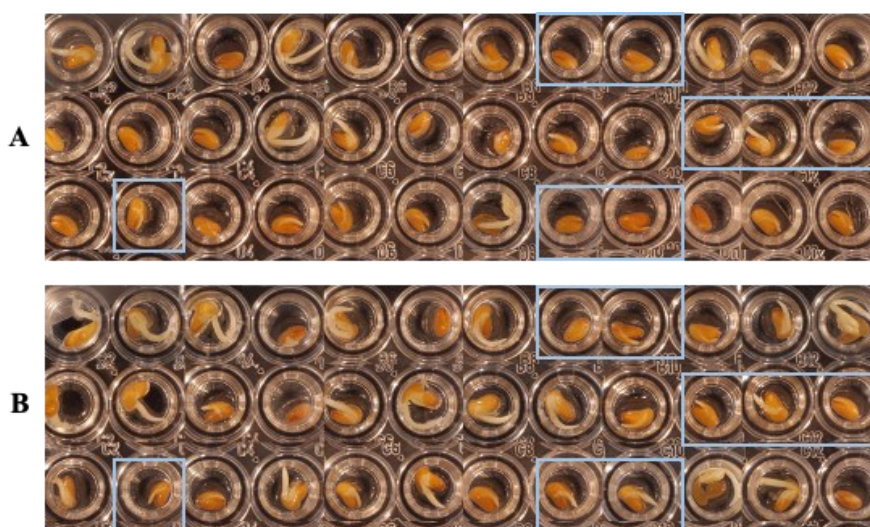
#### **4.4 Application à un extrait éthanolique d'*Impatiens glandulifera* :**

Pour vérifier que les paramètres définis permettaient bien de visualiser une activité antigerminative, l'extrait éthanolique d'IGR a été injecté et les fractions ont été collectées sur deux plaques différentes. Avec une quantité injectée de 400 µg d'extrait, le chromatogramme obtenu présentait des pics sont plus larges que précédemment (**figure II-29**), dont certains provoquant une saturation du signal de détection à 254 nm. Malgré cela, le profil chromatographique est tout à fait comparable à celui obtenu **figure II-27**.



**Figure II-29 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR (en noir) par HPLC-DAD (gradient 1)**

Après la collecte, un témoin positif (la lawsone) a été ajouté dans 12 puits ne contenant pas de fractions collectées. La phase mobile ainsi que les solvants des témoins positifs ont été évaporés à l'aide de l'évaporateur Speedvac pendant 2h30 à 35°C et une solution d'eau contenant du Tween 20 (0,05%) a été ajoutée puis une graine a été déposée dans chaque puits. Au bout de 48 h de culture la germination des graines de cresson a pu être mesurée (**figure II-28**). Quatre zones d'inhibition de la germination des graines de cresson ont pu être observées sur les 2 plaques (**figure II-30**), ce qui laissait supposer la présence d'au moins 4 composés phytotoxiques. Ce couplage a donc permis de mettre en évidence de façon reproductible la présence de composés antigerminatifs dans l'extrait d'IGR, les analyses plus approfondies permettant l'identification de ces molécules ont été réalisées et sont présentées dans le chapitre III.



**Figure II-30 – Germination des graines de cresson au contact des fractions de l'extrait éthanolique d'IGR. Les encadrés bleus désignent les zones d'inhibition de la germination (A et B désignent les deux répliques).**

**Le couplage HPLC – test biologique en ligne a permis dans un premier temps de mettre en évidence de façon rapide des zones d'inhibition de la germination correspondant à de possibles molécules candidates pouvant expliquer l'activité de la balsamine de l'Himalaya. L'approfondissement de l'utilisation de la méthode et la caractérisation de ces molécules sera détaillée dans le chapitre suivant consacré à l'étude de cette plante.**

## **5. Conclusions :**

Une nouvelle méthode de détection de l'activité antigerminative et plus généralement de l'activité phytotoxique de molécules pures et d'un extrait de plante a été mise au point en utilisant des plaques 96 puits. Cette méthode, validée en utilisant une molécule standard, la lawsone, a permis d'obtenir des résultats identiques à ceux obtenus avec la méthode classique utilisant des boîtes de Petri, mais avec un volume d'échantillon et un nombre de graines nécessaires presque 2 fois plus faibles. Après validation, la méthode a été appliquée à un extrait éthanolique de feuilles de balsamine ce qui a permis de visualiser son activité bioherbicide. Enfin l'extrait a été fractionné et l'activité des fractions obtenues a été évaluée directement grâce à un couplage innovant entre séparation HPLC et test d'activité. Ce couplage a en particulier permis de repérer les composés d'intérêt qui sont à l'origine de l'activité de l'extrait analysé. Développée avec le cresson comme plante cible, cette méthode est aussi adaptable à d'autres graines de plantes cibles, qu'elles soient monocotylédones ou dicotylédones. Ceci permet d'élargir le champ des connaissances sur la sélectivité des composés et des extraits testés et d'être en mesure de détecter le plus de composés et d'extraits actifs possibles.

La nouvelle méthode développée a également permis de mesurer la longueur des racines du cresson et peut ainsi apporter une information complémentaire quant à l'action des extraits étudiés. Cette méthode a été utilisée pour l'évaluation de l'activité antigerminative d'extraits de polarités variées de différents organes de la balsamine de l'Himalaya (**chapitre III**), mais également pour le criblage d'autres plantes (**chapitre IV**).



---

# CHAPITRE III

---



## Chapitre III - Etude de l'activité phytotoxique de la balsamine de l'Himalaya

---

### 1. La balsamine de l'Himalaya :

#### 1.1 Description de la plante

La balsamine de l'Himalaya, balsamine géante ou *Impatiens glandulifera* Royle (IGR) est une Balsaminaceae. Elle se caractérise par une taille comprise entre un et trois mètres, une tige rougeâtre et robuste, des feuilles lancéolées (en forme de lance), opposées ou verticillées (deux ou plus sur le même nœud) et pétiolées. Les fleurs sont roses-violettes avec une floraison de juillet à septembre (Tela botanica). Originaires des montagnes de l'Himalaya, elle a été introduite en Europe dans les années 1830 et se développe principalement sur les berges des cours d'eau (**figure III-1**).



Figure III-1 – Photo d'un parterre d'IGR à Gerstheim à gauche (lieu de récolte) et d'une fleur d'IGR à droite

#### 1.2 Une plante invasive :

Cette plante s'est propagée de manière très efficace en France grâce à ses mécanismes de reproduction performants (nectar attirant fortement les pollinisateurs (Chittka et Schürkens, 2001) et dispersion de ses graines à plusieurs mètres). A cause de son efficacité de colonisation du territoire, elle a été classée, en 2017, sur la liste européenne des plantes exotiques envahissantes préoccupantes, qui sont des espèces introduites en dehors de leur aire de répartition naturelle (exotiques) et qui, à cause de leur introduction ou de leur propagation, sont une menace ou peuvent avoir, entre autres, des effets néfastes sur la biodiversité (envahissantes). L'Union Européenne a donc établi une liste de surveillance de ces espèces et mis en place un règlement n'autorisant pas leur mise sur le marché, leur culture et leur transport au sein de l'Union Européenne, ceci afin de limiter leur propagation (Parlement Européen, 2014). Des initiatives ont également été mises en place localement grâce à divers conservatoires dont celui d'Alsace et du Bassin Parisien qui ont permis d'établir une liste hiérarchisée des espèces exotiques envahissantes. Pour ce faire, un système de classement a été mis au point avec 5 catégories : les espèces envahissantes exotiques à préoccupation mineure ; les espèces en liste d'observation ; les espèces potentiellement invasives et les espèces émergentes ou implantées. Différents critères ont été utilisés pour établir cette liste en fonction du statut de l'espèce en Europe, de son mode de dispersion, de son habitat, de l'espèce et de sa reproduction. La balsamine de l'Himalaya a été classée dans la catégorie plante exotique envahissante



implantée et est présente en Alsace, en Champagne Ardenne et en Lorraine. Une autre espèce du genre *Impatiens*, la balsamine à petite fleur (*Impatiens parviflora* DC.) a également été classée dans cette catégorie, mais contrairement à la balsamine de l'Himalaya elle n'est pas sur la liste de surveillance de l'Union Européenne (Duval *et al.*, 2020).

Pour limiter son impact sur l'environnement (érosion des berges, perte de biodiversité) des moyens de contrôle ont été mis en place. Plusieurs méthodes ont été testées pour limiter sa prolifération avec notamment le pâturage ou l'utilisation d'herbicides comme le glyphosate ou le 2,4-D qui, bien qu'étant faciles d'application restent à éviter à cause de leurs effets néfastes sur l'environnement et l'Homme (Pacanoski et Saliji, 2014). Le contrôle biologique est une alternative qui se développe, elle consiste à utiliser un pathogène naturel de l'espèce à éradiquer. Par exemple, au Royaume Uni, un essai a été mis en place visant à contrôler le développement de l'IGR grâce à un champignon qui provoque la rouille : *Puccinia komarovii* var *glandulifera* de deux origines (Inde et Pakistan). Les plantules infectées par ce champignon ont montré des symptômes à partir de 14 semaines après infection, avec une baisse de la survie des plants. De plus, plus l'infection était prononcée plus la taille et le diamètre de la tige étaient réduits. De même, l'expérience a été effectuée sur des plants adultes d'IGR, ce qui a permis de diminuer la production des graines et le nombre de tiges florales des plants infectés par le champignon d'origine pakistanaise (Pollard *et al.*, 2021). Cette méthode de contrôle biologique est intéressante car, à ce jour, aucun effet sur les plantes non ciblées n'a été observé et en réduisant ne serait-ce que la reproduction de la plante (à travers la production de graines ou de fleurs), il serait possible de limiter sa propagation sans utiliser de produits dangereux pour l'environnement.

### **1.3 Composition phytochimique de la balsamine de l'Himalaya :**

La composition phytochimique des différentes parties de la plante a été étudiée et est légèrement différente en fonction des organes étudiés. Le **tableau III-1** présente la liste des principales molécules décrites dans les différents organes de la balsamine de l'Himalaya et leurs familles chimiques, comprenant des flavonoïdes, des naphtoquinones et des acides phénoliques.

Les huiles essentielles issues des parties aériennes ou des racines de cette plante ont été caractérisées par (Szewczyk, Kalemba, *et al.*, 2016) et différentes familles chimiques ont pu être mises en évidence comme les acides gras (avec les acides palmitiques et myristiques présents dans les parties aériennes) et les monoterpènes (comme le limonène ou le  $\beta$ -phellandrène présents dans les parties aériennes). Les huiles essentielles de la plante ne seront pas traitées dans la suite de ce manuscrit, qui se concentre uniquement sur les molécules non volatiles.

**Tableau III-1 – Liste non exhaustive des molécules décrites dans les différentes parties de l'IGR (en gris les acides phénoliques, en orange les naphtoquinones ou dérivés du naphthalène, en bleu les flavonoïdes et en vert les flavonoïdes glycosylés).**

Molécule	Partie plante	Référence
1,2,4- trihydroxynaphtalène	Racines	(Tříška <i>et al.</i> , 2013)
1,2,4-trihydroxynaphtalène-1-O-glucoside	Racines	(Tříška <i>et al.</i> , 2013)
Acide 3-hydroxycinnamique	Feuilles Racines	(Szewczyk et Olech, 2017)
Acide gallique, acide cis-caféique	Fleurs	((Szewczyk and Olech, 2017)
Acide gentisique, acide salicylique, acide syringique, acide trans-caféique, acide trans- <i>p</i> - coumarique, acide transferrulique, acide cis férulique, acide vanillique, acide cis- <i>p</i> -coumarique	Racines Feuilles Fleurs	(Szewczyk et Olech, 2017)
Acide trans-sinapique, acide vétratrique, acide 3- hydroxybenzoïque	Feuilles	(Szewczyk et Olech, 2017)
Acide 4-hydroxybenzoïque (= acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque)	Parties aériennes Racines, Fleurs	(Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Szewczyk et Olech, 2017)
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (= acide protocatéchique)	Parties aériennes Fleurs, Feuilles Racines	(Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Szewczyk et Olech, 2017)
2-hydroxy-1,4-naphtoquinone (= lawsone)	Fleurs Parties aériennes	(Lobstein <i>et al.</i> , 2001) (Block <i>et al.</i> , 2019)
2-méthoxynaphtalene-1,4-dione (= 2-methoxy-1,4-naphtoquinone)	Parties aériennes Fleurs Racines	(Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Lobstein <i>et al.</i> , 2001) (Cimmino <i>et al.</i> , 2016) (Ruckli <i>et al.</i> , 2014) (Block <i>et al.</i> , 2019)
Kaempférol	Fleurs Feuilles	(Vieira <i>et al.</i> , 2016) (Szewczyk, 2018) (Szewczyk, Zidorn, <i>et al.</i> , 2016)
Quercétine	Fleurs Parties aériennes	(Vieira <i>et al.</i> , 2016) (Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Szewczyk, Zidorn, <i>et al.</i> , 2016)
Eriodictyol	Parties aériennes	(Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Szewczyk, Zidorn, <i>et al.</i> , 2016)
Kaempférol-3-rhamnosyl-diglucoside	Fleurs Parties aériennes	(Vieira <i>et al.</i> , 2016) (Szewczyk <i>et al.</i> , 2019)
Myricétine-3-O-galactoside, quercétine-3-O-6"- malonyl-glucoside dihydromyricétine (= ampelopsine) kaempférol-3-O-(6"-malonylglucoside)	Fleurs	(Vieira <i>et al.</i> , 2016)
Quercétine-3-O-galactoside (= hyperoside)	Fleurs Parties aériennes	(Vieira <i>et al.</i> , 2016) (Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Szewczyk, Zidorn, <i>et al.</i> , 2016)
Kaempférol-3-O -rutinoside, (= nicotiflorine), kaempferol 3-O-b-D -galactoside, (trifoline)	Parties aériennes	(Szewczyk <i>et al.</i> , 2019)
Eriodictyol-di-O-hexoside (proposition)	Parties aériennes	(Szewczyk, Zidorn, <i>et al.</i> , 2016)
Quercétine-3-O-glucoside (= isoquercétine)	Parties aériennes	(Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Szewczyk, Zidorn, <i>et al.</i> , 2016)
Eriodictyol-7- O-glucoside, kaempférol-3-O-glucoside (= astragaline)	Fleurs Parties aériennes	(Vieira <i>et al.</i> , 2016) (Szewczyk <i>et al.</i> , 2019) (Szewczyk, Zidorn, <i>et al.</i> , 2016)

#### **1.4 Potentiel allélopathique :**

De par son caractère invasif, la balsamine de l'Himalaya a fait l'objet de plusieurs études afin d'évaluer son potentiel allélopathique sur différentes plantes cibles, principalement pour étudier sa capacité à inhiber la croissance ou la germination.

Par exemple, des plantules d'*Impatiens* sp. ont été cultivées en co-culture par Bieberich *et al.*, (2018) avec des plantules de grande ortie (*Urtica dioica* L.) et de reine des prés (*Filipendula ulmaria* L.). Une perte de biomasse a été observée sur les plants juvéniles d'ortie. De plus, les plants juvéniles (1 an de culture) se sont révélés plus sensibles à la compétition avec l'IGR que les plantules.

Autre exemple, les extraits aqueux de parties aériennes de plants juvéniles d'IGR ont montré une activité inhibitrice de la germination des graines d'épervière des murs (*Hieracium murorum* L.) et de scrofulaire noueuse (*Scrophularia nodosa* L.) à une concentration de 0,25 g/mL contrairement aux extraits de racines de plants juvéniles. En revanche, les extraits de racines de plantes sénescents à une concentration de 0,25 g/mL ont montré une stimulation de la germination des graines de *S. nodosa* (Ruckli *et al.*, 2014). De même, les extraits aqueux, méthanoliques et au dichlorométhane des feuilles d'IGR ont montré une activité antigerminative sur les graines de moutarde blanche (*Leucosinapis alba* (L.) Spach). En revanche, l'extrait au dichlorométhane n'a pas montré d'effet inhibiteur de la germination de graines de colza (*Brassica napus* L.), mais un effet inhibiteur de la longueur des racines (Vrchotová *et al.*, 2011).

Bien que l'activité phytotoxique de la balsamine de l'Himalaya ait déjà été observée sur différents types de plantes cibles, aucun lien direct (réalisé par fractionnement bio-guidé par exemple) n'a été établi entre l'activité antigerminative observée et une ou plusieurs molécules extraites de la plante. L'activité des naphthoquinones telles que la lawsone ou la 2-méthoxy-1,4-naphthoquinone, décrite dans la composition phytochimique de la plante, a cependant été démontrée.

Cette plante était donc un modèle parfait pour cette thèse, idéale pour mettre en pratique le nouveau test développé, dans le but d'identifier et de dénombrer les molécules actives responsables de son activité antigerminative. Pour cela, des extraits ont été réalisés à partir des différentes parties de la balsamine de l'Himalaya : feuilles, racines, tiges et fleurs. En plus de l'étude de plants sauvages, la culture *in vitro* de la plante a été accomplie pour la première fois et des cultures de cellules indifférenciées ont été obtenues permettant d'obtenir un extrait éthanolique de suspensions cellulaires. L'activité antigerminative de ces différents extraits a ensuite été évaluée en utilisant la méthode en plaque 96 puits développée dans le chapitre précédent. Les extraits les plus actifs ont ensuite été étudiés par HPLC-DAD et les molécules

actives ont été identifiées grâce à un fractionnement bio-guidé et des analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution.

## 2. Culture *in vitro* de la balsamine de l'Himalaya :

Les plantes étant des organismes sessiles, elles produisent des métabolites spécialisés pour lutter contre les menaces se trouvant dans leur environnement ce qui induit une variabilité dans le profil métabolique de plantes de la même espèce en fonction des moments de récolte (saison, localisation...). La culture *in vitro* permet de s'affranchir de ces variations environnementales en cultivant les plantes sous différentes formes (cals, suspensions, plantules) en conditions contrôlées ce qui permet d'obtenir un matériel végétal homogène. De plus, ces cultures sont accessibles à n'importe quel moment ce qui permet d'avoir une disponibilité tout au long de l'année, sans contraintes climatiques par exemple.

La culture *in vitro* de la balsamine de l'Himalaya, avec l'obtention de cultures de cellules indifférenciées et de plantules, a permis d'étudier la phytochimie de la plante dans son ensemble (plants à l'état sauvage et suspensions cellulaires en milieu contrôlé) et de pouvoir ainsi déterminer si des composés bioherbicides sont présents également dans des cellules indifférenciées. Cet aspect sera développé dans la partie 4 de ce chapitre. De plus, le contenu métabolique de ces cultures pourrait être modulé grâce à l'élicitation, qui permet d'induire la surproduction de molécules d'intérêt grâce à l'ajout de molécules mimant un stress (les éliciteurs) ou de précurseurs des voies de biosynthèse des molécules d'intérêt.

Pour cultiver une plante *in vitro*, il est possible d'utiliser les différentes parties d'une plante sauvage (Chapitre I – Introduction) en procédant à une stérilisation qui permet d'éviter le développement de microorganismes (champignons, bactéries) lorsque les explants étaient placés sur des milieux nutritifs riches en sucres contenant des balances hormonales variées. La deuxième méthode consiste à utiliser des graines de la plante d'intérêt, de réaliser une stérilisation de surface et de faire germer ces graines en conditions stériles. De cette façon, les plantules obtenues sont axéniques (stériles) et le risque de contamination est réduit. Ces plantules peuvent être ensuite utilisées comme matériel de base pour différents types de culture (**figure III-2**).

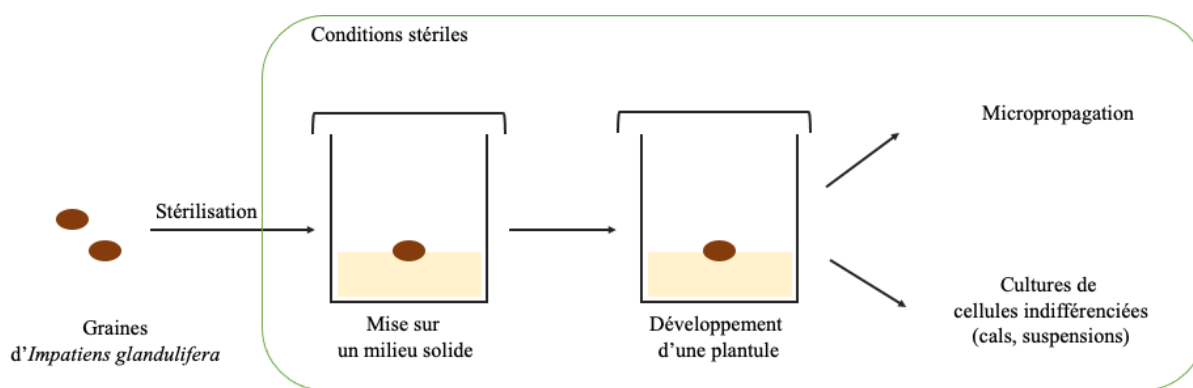


Figure III-2 – Schéma général de mise en culture *in vitro* à partir de graines

A ce jour, aucune étude ne présente la mise en culture *in vitro* de la balsamine de l'Himalaya mais d'autres espèces du genre *Impatiens* ont fait l'objet de culture que ce soit pour préserver une espèce en danger comme au Sri Lanka avec l'*Impatiens repens* Moon (Herath et Wijesundara, 2010), ou à des fins ornementales comme l'*Impatiens hawkeri* W.Bull (Samiei *et al.*, 2018) et l'*Impatiens balsamina* (Mohamed *et al.*, 2019). De plus, cette dernière a déjà fait l'objet d'une étude sur la production de naphthoquinones dans ses suspensions cellulaires (Panichayupakaranant, 2001).

## 2.1 Germination des graines :

Cette approche utilisant des graines a été la première testée pour réaliser la mise en culture *in vitro* de balsamine de l'Himalaya (IGR) afin d'obtenir des cellules indifférenciées. Les graines de balsamine ont été récoltées en Alsace (près de Mulhouse) et stockées au frigo plusieurs mois avant leur utilisation.

Dans un premier temps, les graines d'IGR ont été stérilisées en s'inspirant de l'étude de Taha *et al.*, (2009) en utilisant de l'eau de Javel à 0,1% (v/v) pendant 10 minutes pour régénérer des plantules d'*Impatiens balsamina*. Les graines d'IGR (10 graines par boîte Magenta, 3 boîtes utilisées) ont ensuite été déposées sur un [milieu solide MS](#) supplémenté en vitamines et avec ajout de sucre <sup>13</sup> Les conditions de germination n'étant pas précisées dans l'étude de Taha *et al.*, les graines ont été mises dans une enceinte de culture avec une photopériode 16 h de jour / 8 h de nuit et une température de 25°C. Au bout de 11 jours de culture, aucune germination n'a été observée.

<sup>13</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – parties 4.2.1 et 4.2.2

Plusieurs questions se sont alors posées : les graines ont-elles perdues leur potentiel de germination ? Les conditions de culture sont-elles adaptées ? Les conditions de stérilisation sont-elles trop fortes ?

### 2.1.1 Potentiel de germination :

Pour vérifier le potentiel de germination des graines, 10 graines ont été mises à germer sans être stérilisées dans les mêmes conditions de culture (photopériode 16/8, température 25°C), mais sur papier filtre et non sur milieu gélosé. Au bout de 8 jours, une graine seulement avait germée (sur 10). Les graines ne semblent pas avoir perdu leur potentiel de germination, mais les conditions de culture n'étaient peut-être pas optimales.

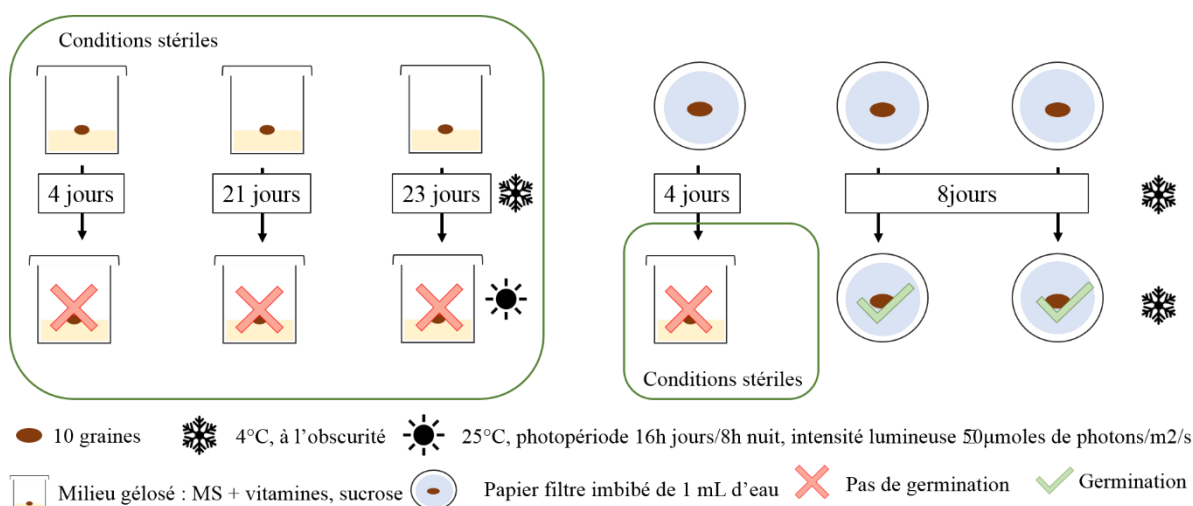
### 2.1.2 Conditions de culture :

Dans l'étude de Mumford (1988), il est montré que les graines d'*Impatiens sp.* ont besoin d'être dans un environnement froid pour germer. Ce phénomène est appelé la stratification, certaines graines en dormance ont besoin d'une période d'exposition au froid qui mime les conditions hivernales pour initier leur germination. Les boîtes Magenta contenant les graines stérilisées<sup>14</sup> qui étaient dans l'enceinte de culture sur milieu gélosé ont été placées à 4°C et à l'obscurité pendant 4 ou 21 jours avant d'être remises dans l'enceinte à 25°C avec une photopériode de 16/8. Des graines non stériles ont été mises sur du papier filtre imbibé avec 1 mL d'eau du robinet et placé à 4°C, à l'obscurité pendant 4 ou 21 jours avant d'être stérilisées et mises dans l'enceinte de culture<sup>14</sup>. Dans le cas des graines stérilisées (en boîte Magenta), aucune germination n'a été observée que ce soit à 4°C et à l'obscurité ou à 25°C avec une photopériode (16h de jour/ 8h de nuit) (**figure III-3**).

Pour les graines non stérilisées, la première boîte contenant les graines mises à 4°C pendant 4 jours et replacée dans l'enceinte de culture après stérilisation n'a permis à aucune graine germée. En revanche, dans les boîtes de graines non stérilisées qui devaient être mises dans l'enceinte de culture au bout de 21 jours, des graines ont germé au bout de 8 jours de culture, 4 graines dans une boîte et 3 graines dans l'autre (**figure III-3**).

---

<sup>14</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – parties 4.2.3



**Figure III-3 – Bilan des résultats obtenus pour le test de stratification des graines d'IGR**

Les conditions ayant permis d'obtenir une germination satisfaisante des graines de balsamine de l'Himalaya correspondent donc à une mise en culture à 4°C dans un environnement humide (1 mL d'eau dans une boîte de Petri de 5 cm pour 10 graines par boîte).

Les graines ont germé en conditions non stériles, mais pas en conditions stériles ce qui impliquait que la stérilisation empêchait les graines de germer, différents protocoles de stérilisation ont donc été testés pour déterminer celui qui permettait aux graines de germer.

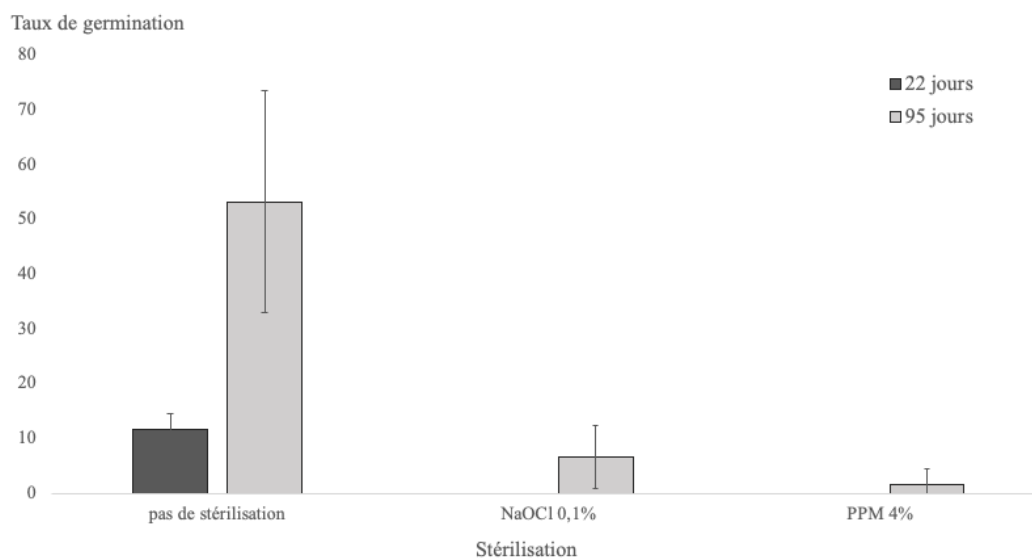
### 2.1.3 Conditions de stérilisation :

Concernant la stérilisation, plusieurs méthodes ont été testées soit en utilisant du PPM (Plant Preservative Mixture) selon les recommandations d'usage qui préconisent la mise des graines dans une solution de PPM à 4% pendant 12 h à 16 h (Plant cell technology), soit de l'eau de Javel (contenant 0,1% de chlore actif), soit sans stérilisation<sup>15</sup>.

Au bout de 22 jours, le taux de germination des graines sans stérilisation était faible (moins de 10 %) et de 0 % avec les deux stérilisations testées. A 95 jours de culture en revanche, le taux de germination des graines non stérilisées dépassait les 50% et quelques graines ont réussi à germer (moins de 10% dans chacun des cas) après stérilisation (**figure III-4**). Les deux stérilisations semblent empêcher la germination des graines d'IGR. L'expérience aurait pu être prolongée pour vérifier si comme pour les graines non stériles le pourcentage de germination augmentait avec le temps, mais 95 jours (soit près de 3 mois et demi) semblaient déjà être un temps suffisamment long pour observer la germination des graines.

<sup>15</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 4.2.4

Ces résultats confirment que le potentiel de germination de ces graines n'a pas été perdu mais que la stérilisation réduit très fortement la germination, même si les conditions de germination sont réunies (froid et humidité).



**Figure III-4 – Taux de germination des graines d'IGR en fonction des différents protocoles de stérilisation testés. Les données sont exprimées en moyenne des taux de germination de 3 boîtes contenant chacune 60 graines.**

Un dernier essai de stérilisation a été effectué en plongeant 10 graines dans un solution éthanol/eau (60/40, v/v) (EtOH 60%) pendant 3 minutes, puis dans l'eau de Javel 5 minutes et enfin en effectuant 3 rinçages à l'eau stérile. Au bout de 13 jours, aucune germination des graines n'a été observée.

En raison de l'absence de germination des graines après stérilisation et du faible taux de germination sans stérilisation (moins de 10 % après 22 jours), les graines ne seront pas stérilisées avant germination, mais les plantules obtenues le seront après germination.

#### **2.1.4 Croissance des plantules à partir des graines :**

Les graines ont été mises à germer sur du papier filtre. Après le développement des plantules, ces dernières ont été placées dans l'enceinte de culture avec photopériode pour continuer leur développement. En effet, à l'obscurité, ces plantules se sont développées de manière étiolée : feuilles plus petites et jaunes et tige plus longue et moins robuste que lorsqu'on les place à la lumière (**figure III-5**).



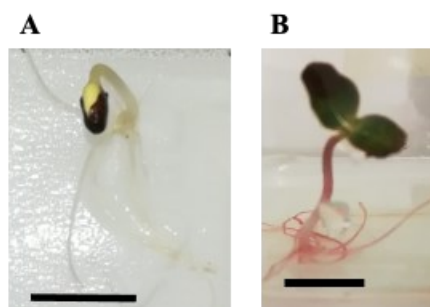


Figure III-5 – Développement des plantules d'IGR à l'obscurité pendant 21 jours (A) et développement de la même plantule après 4 jours à la lumière (B). Le trait noir représente 1 cm.

Les graines germant petit à petit, 3 plantules ont été obtenues dans un premier temps, puis deux de plus. Les graines tout juste germées ont également été utilisées pour la suite.

## 2.2 Mise en place des cultures de cals :

Pour la mise en place des cultures de cellules indifférenciées (cals puis suspensions cellulaires), les plantules obtenues après germination des graines, des graines germées avant le stade plantule (nommées graines germées par la suite) et des plants sauvages d'IGR ont été utilisés (**figure III-6**). Un protocole de stérilisation a été mis en place pour permettre la mise en culture des explants (feuilles, graines, racines ou tiges) sur un milieu gélosé contenant une balance hormonale constituée d'une auxine, l'acide dichlorophenoxyacétique (2,4-D) ou l'acide naphtalène acétique (ANA) et d'une cytokinine la benzyladenine appelée également 6-Benzylaminopurine (BAP). Ces hormones ont été testées à différentes concentrations afin de déterminer quelle balance hormonale permettait d'obtenir des cals d'IGR.

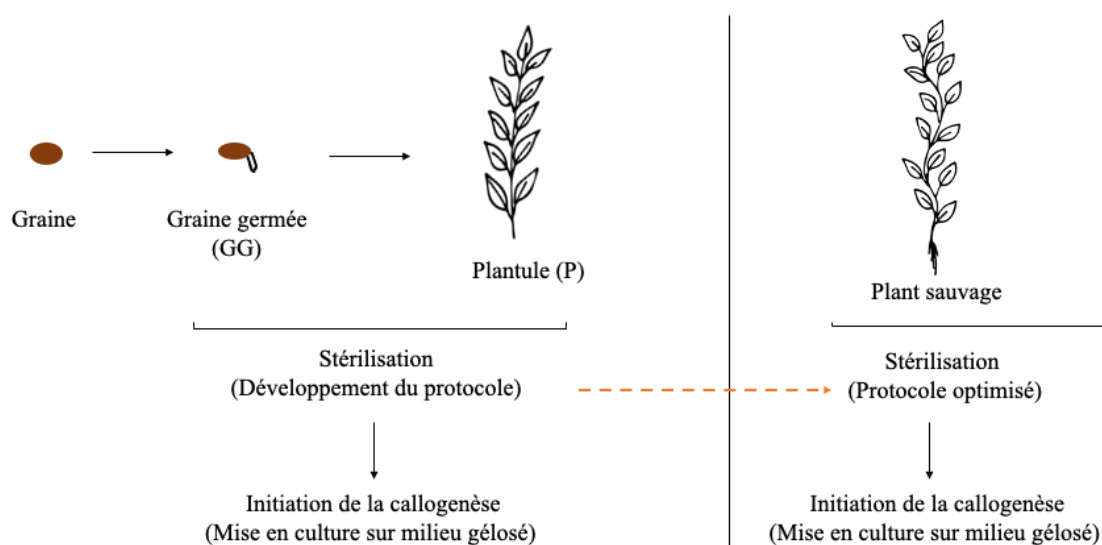


Figure III-6 – Différentes étapes permettant l'initiation de la callogenèse à partir de graines germées, de plantules et une fois le protocole de stérilisation optimisé à partir de plant d'IGR sauvages.

### 2.2.1 Essai avec les plantules obtenues à partir des graines et avec des graines germées :

Les plantules provenant des graines germées avaient besoin d'être stérilisées avant de pouvoir être placées sur un milieu de culture stérile pour la formation des cals. Plusieurs protocoles de stérilisation ont été expérimentés, pour les différentes parties des plantules (divisées en explants : hypocotyle (= explant caulinaire), feuilles ou cotylédons, racines) ou sur les graines germées (**tableau III-2**). Après chaque stérilisation utilisant de l'eau de Javel, les graines ont été rincées 3 fois dans de l'eau distillée stérile.

**Tableau III-2 – Bilan des différents protocoles de stérilisation testés à partir des graines germées (GG) et des plantules (P).**

Protocole	Matériel végétal	Stérilisation	Milieu
1	P	EtOH 60% – 3 minutes Eau de Javel (0,1% chlore actif) – 2 minutes	ANA/BAP (1/0,5)
2	P	EtOH 60% - 3 minutes Eau de Javel (0,1% chlore actif) – 5 minutes 30 secondes	ANA/BAP (1/0,5)
3	P + GG	Milieu MS + vitamines + PPM 4% – 8h	ANA/BAP (1,5/0,5) +PPM 2,4-D/BAP (1,5/0,5) +PPM
4	P	Eau de Javel (2,5% chlore actif) – 4 minutes	Sans hormones ANA/BAP (1,5/0,5) +PPM 2,4-D/BAP (1,5/0,5) +PPM

Dans un premier temps, les plantules ont été stérilisées avec de **l'EtOH 60% (pendant 3 minutes) suivi par un bain d'eau de Javel (0,1% de chlore actif) pendant 2 minutes (tableau III-2-Protocole 1)**, avant d'être placées sur un milieu ANA/BAP (1 mg/L/0,5 mg/L). Dès 4 jours de culture, des contaminations dues au développement de microorganismes ont été observées au niveau des explants caulinaires, la stérilisation n'avait pas fonctionné.

Dans un deuxième temps, les plantules ont été stérilisées dans un bain d'**EtOH 60% pendant 3 minutes suivi d'un bain d'eau de Javel (0,1% de chlore actif) pendant 5 minutes 30 secondes (tableau III-2-Protocole 2)** et placées sur un milieu ANA/BAP (1 mg/L/0,5 mg/L). Au bout de 3 jours, des contaminations ont été visibles sur les parties aériennes, mais pas sur les parties racinaires. Les conditions de stérilisation semblaient suffisantes pour les racines, mais trop faibles pour stériliser les hypocotyles et les cotylédons (plus épais). Neuf jours après la mise en culture, les explants récupérables (racines et parties aériennes) ont été transférés sur un milieu ANA/BAP contenant 1% de PPM pour tenter de

réduire les nouvelles contaminations. Toutefois, 7 jours après transfert sur le milieu contenant du PPM, de nouvelles contaminations ont été observées, ce qui a confirmé que les conditions de stérilisation des explants n'étaient pas adaptées.

Dans un troisième temps, une stérilisation a été testée avec du **PPM à 4%** (tableau III-2-Protocole 3). Les explants de plantules et graines germées ont été placés sur deux types de milieux 2,4-D/ BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L) et ANA/BAP, (1,5 mg/L/0,5 mg/L) contenant 0,1% de PPM. Au bout de 6 jours, les explants étaient de nouveau contaminés et aucun développement de cals n'a été observé.

En dernier lieu, un ultime protocole de stérilisation a été expérimenté (**tableau III-2-Protocole 4**) en utilisant de **l'eau de Javel à 2,5% de chlore actif**. Les différentes parties des plantules, cotylédons, racines et hypocotyles ont été déposées sur 3 milieux différents pour voir l'impact des hormones sur la callogenèse. Après 5 jours de culture, des contaminations sont apparues sur les explants des cotylédons. Les explants racinaires n'ont pas développé quant à eux de cals et la contamination a été restreinte.

Pour conclure, le protocole de callogenèse utilisant des graines mises à germer pour obtenir des plantules qui seront stérilisées n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés. Le taux de germination faible des graines ne permet pas d'avoir beaucoup de matériel végétal pour tester les différentes conditions de culture et le protocole de stérilisation s'est révélé inefficace pour prévenir les contaminations.

Pour ces différentes raisons, des jeunes plants d'IGR ont été récoltés dans la nature et pour les essais de callogenèse suivants, des explants frais issus de plantes sauvages ont été utilisés.

## **2.2.2 Callogenèse à partir de plants sauvages de balsamine de l'Himalaya :**

### **2.2.2.1 Tests préliminaires de stérilisation et de callogenèse :**

Un premier essai a été effectué pour tester le protocole de stérilisation consistant en un bain dans l'eau de Javel (0,25 % de chlore actif) suivi de 3 rinçages dans de l'eau distillée stérile durant 5 minutes <sup>16</sup> sur des plants sauvages (les feuilles étant plus fines que les cotylédons utilisés jusqu'à présents, mais les racines et les tiges plus épaisses), mais également pour tester différentes balances hormonales (**figure III-7**).

---

<sup>16</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – parties 4.3.2 et 4.3.3

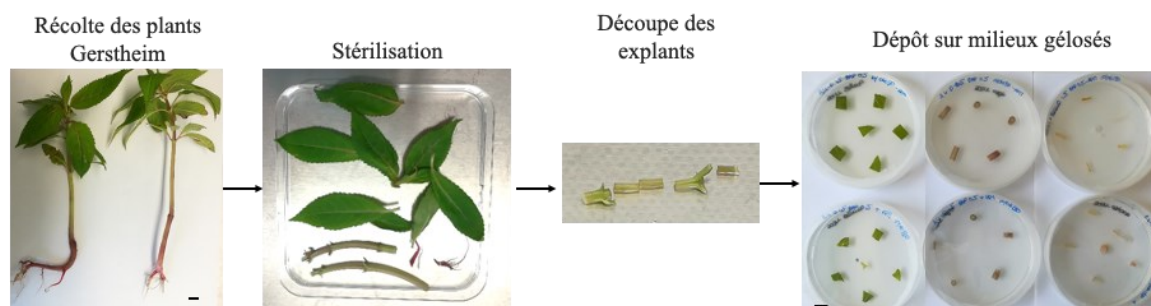


Figure III-7 – Protocole de mise en culture des explants à partir de plantes sauvages

Au bout de 4 jours, quelques contaminations étaient visibles. Au niveau des explants foliaires, un brunissement a été observé avec peu de contaminations. Ceci pouvait être dû à un protocole de stérilisation trop fort pour les feuilles qui sont assez fines (**figure III-8**). Au contraire, pour les explants racinaires et caulinaires, le double de contamination a été observé, ces parties étant plus « épaisses », le protocole de stérilisation n'avait pas permis d'éliminer tous les contaminants exogènes. Le protocole de stérilisation pour les explants caulinaires devra donc avoir un temps de contact plus long avec l'eau de Javel.

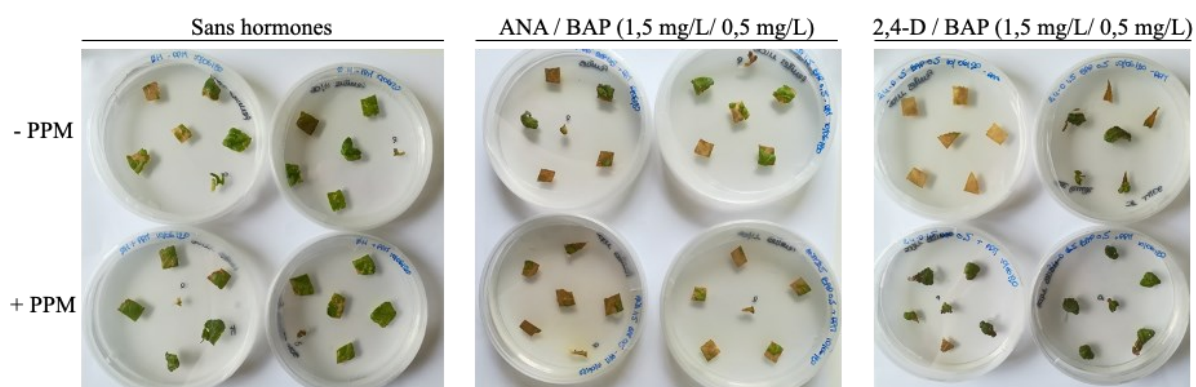
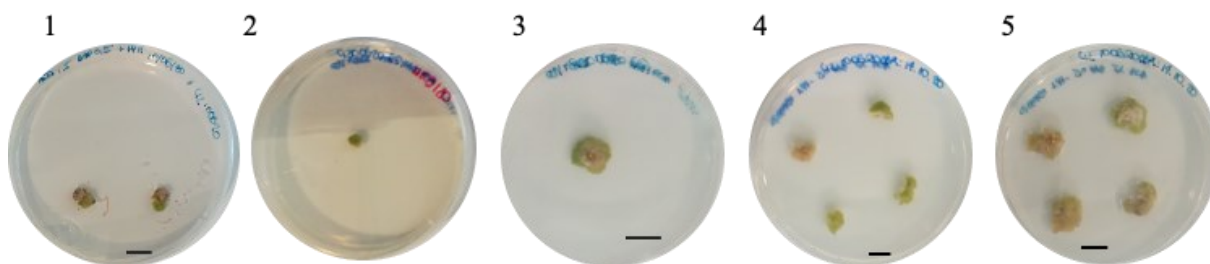


Figure III-8 – Évolution des explants foliaires après 4 jours de culture sur 3 milieux différents contenant ou non du PPM.

Après 15 jours de culture, les explants mis sur les milieux contenant du 2,4-D ou de l'ANA + PPM s'étaient repliés sur eux-mêmes et des amas de cellules blanches/vertes ont été observés. Après 12 semaines de cultures, des cals étaient visibles sur les explants foliaires cultivés sur le milieu ANA/BAP (**figure III-9 (1)**). Ces cals ont été placés sur du milieu de culture frais avec ou sans PPM (**figure III-9 (2)**) et mis à pousser pendant un mois (**figure III-9 (3)**) au bout duquel un repiquage a été fait sur un milieu sans PPM (**figure III-9 (4)**). En effet, le PPM peut avoir des effets délétères sur la formation des cals même si en dessous de 0,2% (v/v) aucun effet délétère ne devrait être observé (Compton et Koch, 2001). Il est utile d'introduire le PPM à l'initiation de la callogenèse pour limiter les contaminations, mais quand les cultures ne présentent plus de signe de contaminations, il est préférable de s'en affranchir.

Un mois plus tard, les cals ont de nouveau été placés sur un milieu frais (repiquage) (**figure III-9 (5)**) et une courbe de croissance a été établie. Cette lignée a été appelée **la lignée 1**.



**Figure III-9 – Évolution des cals de la lignée 1 au fil des repiquages sur milieu ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L) à partir d'explants foliaires : (1) à 12 semaines après la mise en culture, (2) repiqués sur un milieu frais, (3) un mois plus tard, (4) repiqués de nouveau sur un milieu frais sans PPM, (5) de nouveau après un mois de culture. Le trait noir représente 1 cm.**

Les tests préliminaires ont permis de mettre au point des protocoles de stérilisation et de callogenèse qui donnaient des résultats satisfaisants avec l'obtention de cals au bout de quelques semaines de culture. Des essais à plus grande échelle ont également été réalisés pour déterminer avec plus de précision la nature des explants et la balance hormonale la plus adaptée à la callogenèse de la balsamine de l'Himalaya.

#### **2.2.2.2 Test des différents explants /Test des différentes balances hormonales :**

La première expérience a permis de déterminer que les explants foliaires étaient les plus adaptés pour l'initiation de cals. L'expérience a été reproduite 3 fois afin de vérifier la répétabilité des résultats obtenus sur un plus grand nombre de matériel végétal. Cette expérience a également permis de déterminer la balance hormonale la plus adaptée pour la callogenèse de l'IQR. Cinq boîtes de Petri ont été utilisées par condition (balance hormonale) contenant chacune 6 explants foliaires <sup>17</sup>.

##### 2.2.2.2.1 Taux de contamination en fonction des répétitions :

En premier lieu, le taux de contamination moyen pour chaque répétition et chaque milieu a été évalué (**tableau III-3**) <sup>18</sup>. Ce taux diminue au fur et à mesure des répétitions jusqu'à atteindre 5% pour la dernière série. Pour la dernière répétition, le nombre de feuilles stérilisées en même temps dans un même bain a été réduit permettant de bien stériliser la surface de chaque feuille et de réduire les contaminations une fois les explants au contact du milieu gélosé.

<sup>17</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 4.3.3

<sup>18</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 4.3.4

**Tableau III-3 – Bilan du pourcentage de contamination après 7 jours de culture pour chaque milieu et chaque répétition**

Répétition	Milieu sans hormone	Milieu 2,4-D/BAP	Milieu ANA/BAP	Contamination moyenne
1	31,4	22,9	11,4	21,9
2	11,4	22,9	22,9	19,0
3	8,6	0,0	5,7	4,8

#### 2.2.2.2.2 Comparaison des milieux :

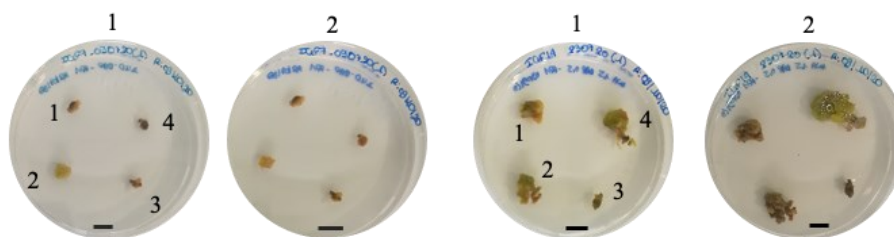
Les différentes balances hormonales ont ensuite été comparées en évaluant le nombre de cals obtenus par balance hormonale. Concernant le milieu sans hormone, aucun développement de cals n'a été observé, les explants foliaires ont brunis. Concernant les deux balances hormonales testées, le comptage du nombre de cals après repiquage au bout de plusieurs semaines de culture a montré des différences entre les différents réplicats (**tableau III-4**). Ces différences peuvent être expliquées par le taux de contamination élevé lors des deux premiers réplicats, ayant entraîné une perte d'explants. Les 2 balances hormonales testées ont permis le développement de 21 et 31 cals respectivement sur un total de 60 explants lors du 3<sup>ème</sup> réplicat. La balance hormonale ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L) semblait la plus adaptée compte tenu du nombre plus important de cals obtenus au total pour chaque série.

**Tableau III-4 – Nombre de cals total développés après 2 mois de mise en culture pour chaque milieu testé**

Répétition	Milieu sans hormone	Milieu 2,4-D/BAP	Milieu ANA/BAP
1	0	5	7
2	0	13	13
3	0	21	31

A chaque repiquage, les parties les plus friables et les plus claires des cals ont été sélectionnées permettant ainsi d'obtenir des cals de plus en plus homogènes au fur et à mesure des repiquages. Une comparaison de la croissance des cals sur chacun des milieux (2,4-D/BAP et ANA/BAP) a été effectuée en mesurant l'aire de chaque cal à l'aide d'ImageJ (**figure III-10**)<sup>18</sup>.

Au bout de 28 jours, les cals sur milieu 2,4-D/BAP, avaient une croissance comprise entre 15 et 56%. Le cal 4 avait une aire plus faible au bout de 28 jours de culture qu'au moment initial de la mise en culture, ce qui peut s'expliquer par un assèchement du cal et un repli sur lui-même. En revanche, pour les cals sur milieu ANA/BAP au bout de 20 jours, la croissance était déjà comprise entre 15 et 123%. La mesure de la croissance s'est arrêtée au bout de 20 jours afin de diviser en 4 le cal numéro 4 (ayant atteint une taille nécessitant son repiquage) et de le placer sur un milieu frais. Ce cal est à l'origine de **la lignée 2**.



Milieu	2,4-D/BAP (1,5 mg/mL/ 0,5 mg/mL)			ANA/BAP (1,5 mg/mL/ 0,5 mg/mL)		
	Aire J <sub>0</sub>	Aire J <sub>28</sub>	Croissance (%)	Aire J <sub>0</sub>	Aire J <sub>20</sub>	Croissance (%)
1	0,21	0,26	20,00	0,94	1,36	44,98
2	0,28	0,44	55,67	1,30	1,79	37,38
3	0,17	0,20	14,28	0,31	0,35	14,24
4	0,20	0,18	-7,10	1,528	3,41	123,43

Figure III-10 – Aire (en cm<sup>2</sup>) des cals sur milieu 2,4-D/BAP (1,5 mg/mL/0,5 mg/mL) et ANA/BAP (1,5 mg/mL/0,5 mg/mL) après mise en culture (1) et après 28 ou 20 jours de culture (2) et taux de croissance des cals.

Malgré un taux de contamination fluctuant en fonction des répétitions d'expérimentation, les explants foliaires permettent d'obtenir des cals d'IGR de couleur verte, friables et se développant bien (croissance permettant à partir d'un cal d'en obtenir 4) au bout de 3 mois de repiquage sur un milieu ANA/BAP (1,5 mg/mL/ 0,5 mg/mL). Ces cals pourraient être utilisés pour la mise en place de cultures en milieu liquide (suspensions cellulaires).

### 2.2.2.3 Choix de la lignée pour mettre en place les suspensions cellulaires :

Deux lignées de cals (1 et 2) ont été établies précédemment, à partir de feuilles d'IGR sauvages et se développant sur un milieu ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L). Afin de choisir les cals les plus adaptés à la mise en suspension, des courbes de croissance ont été établies pour ces deux lignées (**figure III-11**)<sup>19</sup>.

Pour la lignée 1, 3 boîtes contenant chacune 4 cals ont été utilisées et la masse des cals a été relevée tous les 7 jours pendant 28 jours (**figure III-11 (A)**). Pour la boîte 1, la masse totale des cals semblait croître entre le jour 0 et le jour 28 mais à cause de la variabilité entre les cals de la boîte, aucune différence significative n'a été observée entre la masse obtenue aux différents jours de mesure selon le test de Tukey au seuil de risque  $\alpha = 0,05$ . Le même résultat a été observé pour les boîtes 2 et 3 dont la variabilité des masses des cals était plus faible.

Pour la lignée 2, 4 boîtes contenant chacune 4 cals ont été utilisées et la masse des cals a été relevée tous les 7 jours pendant 21 jours (**figure III-11 (B)**). Pour chacune des boîtes, la

<sup>19</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 4.3.5

masse des cals augmentait significativement en fonction du temps de culture. Une différence a été observée entre la masse obtenue le premier jour et la masse obtenue le 21<sup>ème</sup> jour selon le test de Tukey au seuil de risque  $\alpha = 0,05$ . Pour les boîtes 2 et 4, une différence était déjà visible entre la masse du premier jour et celle du 14<sup>ème</sup> jour. Les mesures ont été arrêtées au 21<sup>ème</sup> jour car les cals étaient volumineux dans la boîte et touchaient déjà le couvercle, ils ont donc été repiqués.

En comparant la croissance des deux lignées de cals obtenues, la lignée 2 a montré la plus forte croissance et les cals les plus friables. Ainsi, elle semblait être la plus adaptée pour l'obtention de suspensions cellulaires, les cals friables permettaient d'obtenir une suspension homogène et leur bonne croissance permettait d'avoir une suspension se développant bien. Parmi les boîtes de la lignée 2, la boîte 2 présentait la croissance la plus élevée et a été choisie pour obtenir les suspensions.

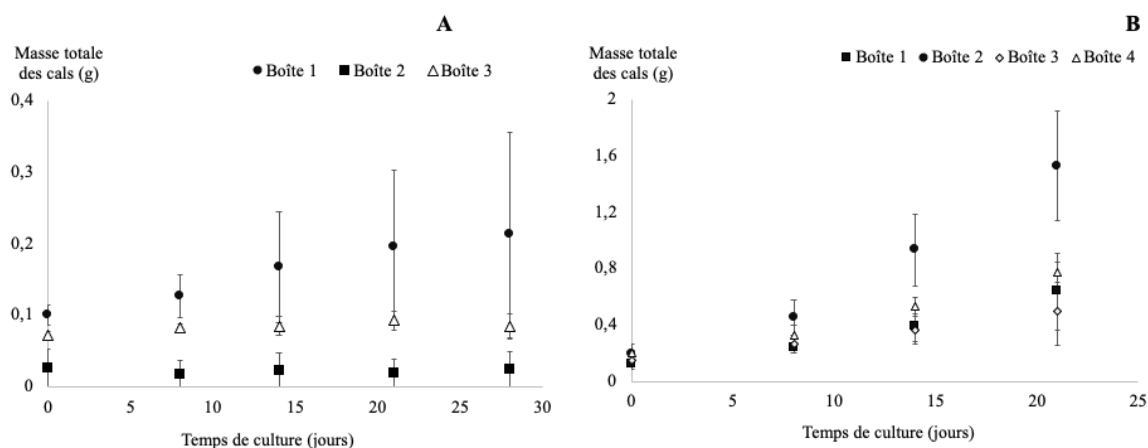


Figure III-11 – Courbes de croissance des deux lignées de cals en fonction du temps de culture (A) lignée 1 et (B) lignée 2.

## 2.2.3 Mise en culture des suspensions cellulaires :

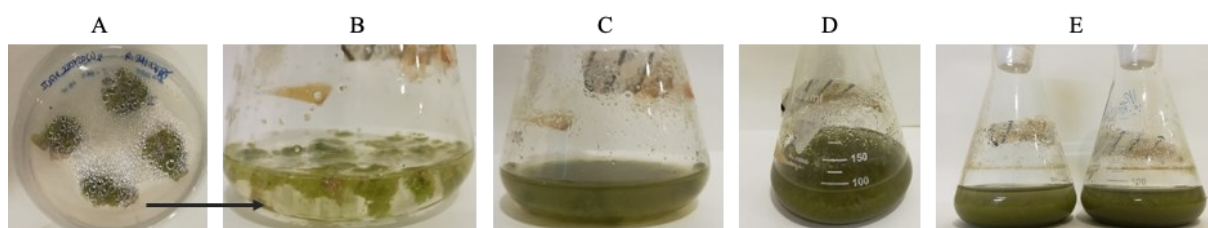
### 2.2.3.1 Mise en suspension des cals :

A partir de la boîte 2 de la lignée 2, 5 g de cals ont été placés dans 50 mL de milieu liquide avec la même balance hormonale (ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L))<sup>20</sup> que celle sur laquelle les cals se développaient convenablement (**figure III-12 (A et B)**). Cette suspension a été mise sous agitation (130 rpm) pendant 7 jours (**figure III-12 (C)**), puis 50 mL supplémentaires de milieu liquide ont été ajoutés dans l'erlenmeyer. Au bout de 17 jours, une suspension plus homogène (**figure III-12 (D)**) que celle de départ a été obtenue. Cette suspension a pu être

<sup>20</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – parties 4.4.1 et 4.4.2



diluée au demi et divisée en 2 suspensions (**figure III-12 (E)**), l'une devant servir à la culture à la lumière et l'autre, à l'obscurité.



**Figure III-12 – Initiation d'une suspension et évolution au fil du temps : (A) (B) initiation de la suspension ; évolution de la suspension (C) après 7 jours de culture, (D) suspension diluée au demi après 17 jours et (E) dilution au demi et division en 2 erlenmeyers de la suspension.**

### 2.2.3.2 Multiplication des suspensions cellulaires :

Les deux suspensions cellulaires ainsi obtenues ont été repiquées toutes les trois semaines avec une dilution au quart ce qui permettait de renouveler le milieu pour permettre aux cellules de continuer à se développer<sup>21</sup>. Toutes les trois semaines, à partir d'une suspension mère, 2 ou 3 suspensions filles supplémentaires étaient donc obtenues, elles-mêmes utilisées comme suspension mère au repiquage suivant (3 semaines plus tard) (**figure III- 13**).



**Figure III-13 – Photos des suspensions cellulaires d'IGR cultivées dans un milieu ANA/BAP (1,5 mg/mL/0,5 mg/mL) permettant leur multiplication**

### 2.2.3.3 Mise à l'obscurité :

Les suspensions à la lumière se développant bien, une tentative de culture à l'obscurité a été effectuée. En effet, en se développant dans des environnements différents, les profils métaboliques des suspensions cellulaires devraient être différents.

Une série de suspensions a donc été mise en culture à l'obscurité sous agitation (130 rpm) et à 25°C. Au bout de 18 jours, les suspensions à l'obscurité et à la lumière sont comparées (**figure III-14**). Un retard de croissance est observé pour la suspension à l'obscurité. En effet, le volume occupé par les cellules dans les suspensions mises à l'obscurité est plus faible que celui des suspensions mises à la lumière (**figure III-14 (trait pointillé orange)**). Ceci indique que le nombre et/ou la taille des cellules est plus faible en condition de croissance à l'obscurité.

<sup>21</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 4.4.2

La couleur des suspensions est passée de verte à jaune-beige lors de la croissance à l'obscurité. Ce changement de couleur des suspensions à l'obscurité a également été observé par Wang *et al.*, (2012) lors de la culture de cellules d'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana* L.) et s'explique par la perte des molécules de chlorophylles lors de la culture à l'obscurité .

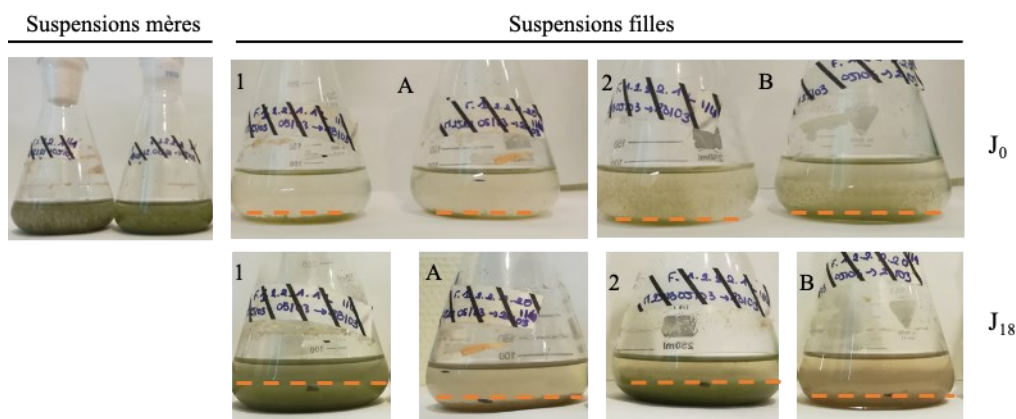


Figure III-14 – Comparaison des suspensions au moment de la mise en culture à la lumière et à l'obscurité (J<sub>0</sub>) et après 18 jours de culture (J<sub>18</sub>). Le trait orange pointillé représente le volume occupé par les cellules dans la suspension. (1) (2) : suspensions cultivées à la lumière, (A) (B) : suspensions placées à l'obscurité.

Les cultures de cellules végétales peuvent se faire à l'obscurité ou à la lumière en fonction des cellules étudiées et des molécules à produire. Par exemple, dans l'étude d'Andi *et al.*, (2019), les cultures de vigne (*Vitis vinifera* L.) à l'obscurité produisaient 3 fois plus de stilbénoides que celles à la lumière.

Concernant les cellules d'IGR, elles se développaient mieux à la lumière selon les résultats obtenus précédemment. Cette observation semble cohérente avec les observations de Panichayupakaranant, (2001) sur la culture de suspensions cellulaires d'*Impatiens balsamina*. Ce sont donc les cellules cultivées à la lumière qui seront utilisées pour le suivi de croissance.

#### 2.2.3.4 Courbe de croissance des suspensions cellulaires :

Afin de caractériser plus précisément la culture des suspensions à la lumière, leurs courbes de croissance ont été établies de la façon suivante. Tous les 3 jours, une partie des suspensions est retirée de l'enceinte, puis centrifugée pour récupérer les cellules et peser leur masse fraîche, ces cellules sont ensuite lyophilisées ce qui permet d'obtenir la masse sèche<sup>22</sup>.

Les courbes de croissance que ce soit pour la masse fraîche ou la masse sèche sont présentées dans la **figure III-15**. Les suspensions cellulaires ont montré un début de phase exponentielle de croissance au bout de 5 jours de culture. Cette phase est caractérisée par une

<sup>22</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 4.4.3

augmentation de la masse cellulaire et par un taux de croissance de 2,6 pour la masse fraîche et de 2,9 pour la masse sèche. Cette phase a duré environ 15 jours, et les cultures cellulaires sont ensuite entrées en phase stationnaire (les masses fraîches et sèches restent constantes). La période de croissance observée est cohérente avec celle décrite par Panichayupakaranant, (2001) pour les suspensions d'*Impatiens balsamina* qui est de 22 jours contre 20 jours dans cette étude et qui peut s'expliquer par une dilution des suspensions différentes (1/5 dans l'étude de Panichayupakaranant, (2001) contre 1/4 dans cette étude).

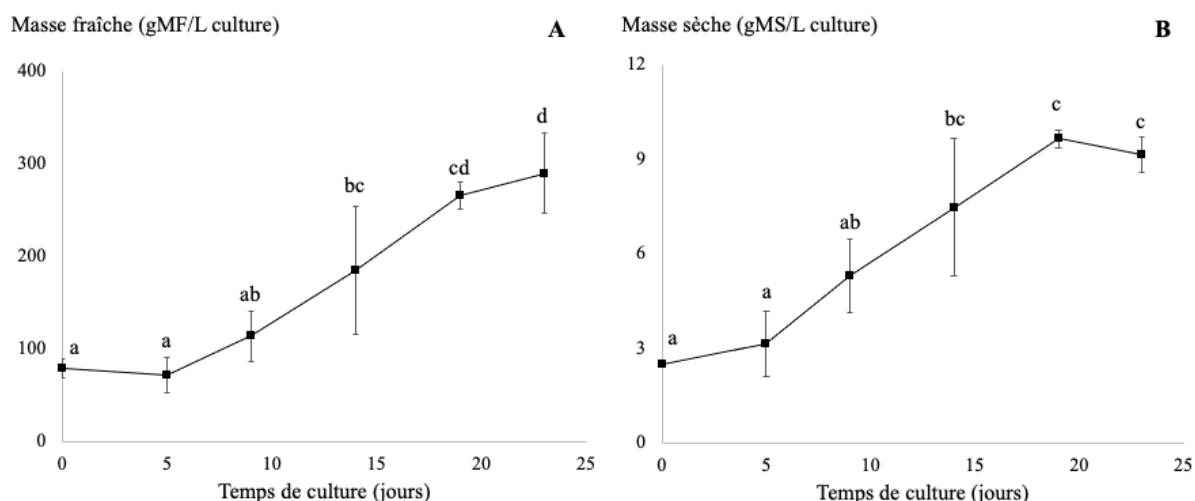


Figure III-15 – Courbe de croissance des suspensions d'IGR sur un milieu ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L) (A) masse fraîche, (B) masse sèche. Les résultats sont exprimés en moyenne +/- l'écart type de trois réplicats. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les valeurs obtenues selon le test de Tukey à  $\alpha = 0,05$ .

## 2.2.4 Micro-propagation – Obtention de plantules

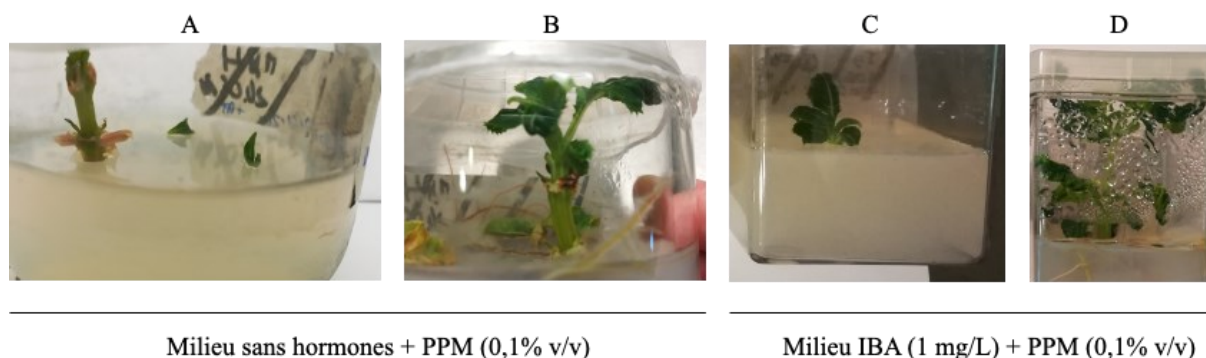
Pour régénérer et multiplier les plantules d'IGR, des explants caulinaires contenant un nœud ont été prélevés sur les plantules récoltées pour initier la callogenèse. Ce procédé avait été utilisé par Herath et Wijesundara (2010) pour l'*Impatiens repens* Moon, une plante médicinale du Sri Lanka.

### 2.2.4.1 Obtention de plantules :

Dans un premier temps ces explants ont été stérilisés avec de l'eau de Javel (0,25% pendant 8 minutes) et ont été placés sur un milieu sans hormones + PPM (figure III-16 (A)) pendant 1 mois pour permettre le développement de la partie aérienne (figure III-16 (B))<sup>23</sup>. Des contaminations ont été observées notamment lors de la première répétition pour laquelle tous les explants ont été contaminés, pour la deuxième répétition, 50 % des explants ont été contaminés. Les explants se développant bien ont été placés sur un milieu contenant de l'IBA

<sup>23</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – parties 4.5.1 et 4.5.2

(1 mg/L) + PPM (**figure III-16 (C)**) pendant un mois permettant le développement de la partie racinaire (**figure III-16 (D)**).



**Figure III-16 – Régénération d'une plantule entière (D) à partir d'un explant caulinaire (A) grâce à une culture sur milieu sans hormone (B) puis un repiquage sur milieu contenant de l'IBA (C).**

#### 2.2.4.2 Multiplication des plantules :

Dans l'objectif de cultiver du matériel végétal en conditions contrôlées en quantité suffisante pour la production de métabolites d'intérêt ou d'autres applications, il est nécessaire de parvenir à multiplier les plantules précédemment obtenues. Pour cela, des explants caulinaires contenant un nœud (une plantule donne plusieurs explants en fonction de sa taille) ont été prélevés sur les plantules obtenues au point précédent et cultivés sur un milieu solide avec une balance hormonale (BAP/KIN(1/0,5) (**figure III-17 (A)**) comme utilisé par Thiyagarajan et Venkatachalam (2013) pour la multiplication de pousses de *Gymnema sylvestre*. Cette même balance hormonale contenant un ratio BAP/KIN a été utilisée par Herath et Wijesundara (2010) pour la multiplication des pousses d'*Impatiens repens*. Au bout de 25 jours, des pousses se sont développées (**figure III-17 (B)**) et ont été placées sur un milieu sans hormones permettant le développement de la partie racinaire à partir de l'auxine produite par l'apex de la pousse elle-même. A partir de 4 explants déposés sur milieu gélosé, entre 2 à 3 fois plus de pousses ont pu être mises sur milieu sans hormones (**figure III-17 (C)**). Au bout de 20 jours (**figure III-17 (D)**), les plantules ont été repiquées sur un nouveau milieu pour leur permettre de continuer leur croissance. Au bout de 29 jours de culture, les plantules ont redéveloppé un système racinaire (**figure III-17 (E)**). Cette opération peut être répétée plusieurs fois, pour obtenir le nombre de plantules nécessaires aux expérimentations.

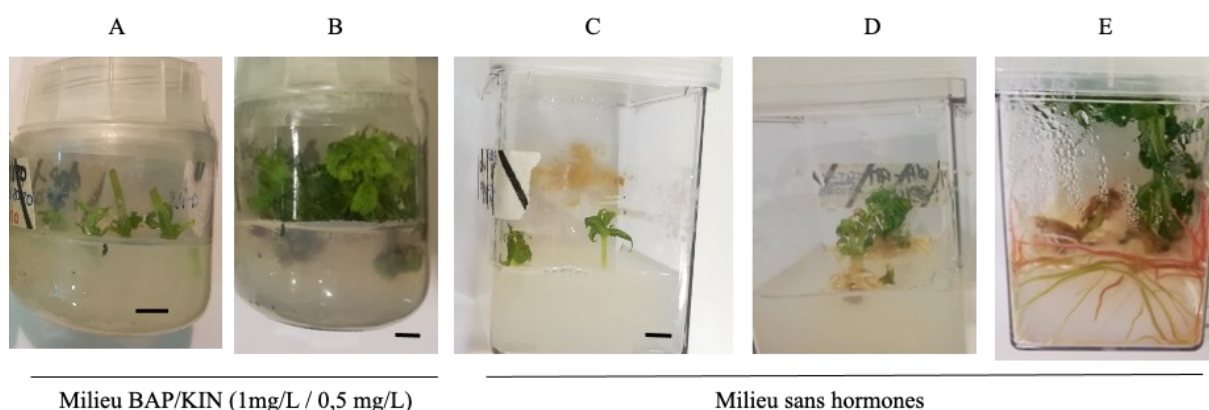


Figure III-17 – Multiplication à partir d'explants caulinaires de pousses d'IGR.

La culture *in vitro* d'IGR a ainsi pu être réalisée pour la première fois. Ceci a permis à partir de plants de balsamine sauvages d'obtenir des cultures de cellules indifférenciées, puis de cals et enfin de plantules. Les suspensions cellulaires pourront être élicitées par la suite pour produire des molécules d'intérêt, de même que les plantules qui pourront intégrer des expériences de co-culture avec d'autres plantes.

### 3. Évaluation de l'activité des différentes parties de la plante :

#### 3.1 Extraction des différentes parties de la plante :

Des plantes entières de balsamine de l'Himalaya ont été récoltées. Les différents organes ont été séparés (racines, tiges, feuilles, fleurs), puis congelés et cryobroyés grossièrement. Les 4 organes et les suspensions cellulaires ont ensuite été lyophilisés avant d'être broyés en poudre fine utilisée comme matrice pour l'extraction. Six solvants de polarités différentes ont été utilisés pour ces différentes matrices : l'heptane, l'acétate d'éthyle, l'isopropanol, l'éthanol, un mélange éthanol/eau (60/40, v/v) et l'eau permettant ainsi d'extraire des molécules de polarités diverses. Seul un extrait éthanolique a été réalisé pour les suspensions cellulaires suivant le même protocole que pour l'obtention des autres extraits.

Pour réaliser les extraits, la poudre de plante a été mise en contact avec le solvant selon un ratio 1 :10 (3 g de plante pour 30 mL de solvant) et mise à macérer pendant 30 minutes sous agitation. Après centrifugation, le surnageant a été récupéré et le culot a été soumis à deux nouveaux cycles d'extraction avec du solvant frais<sup>24</sup>. Puis une évaporation à sec des extraits a été réalisée à l'évaporateur rotatif sous vide puis sous flux d'azote permettant d'obtenir les masses d'extraits secs.

Les rendements d'extraction ((masse finale d'extrait sec obtenue / masse de poudre sèche prélevée au départ) x 100) ont été calculés pour chaque organe et chaque solvant utilisé (**tableau**

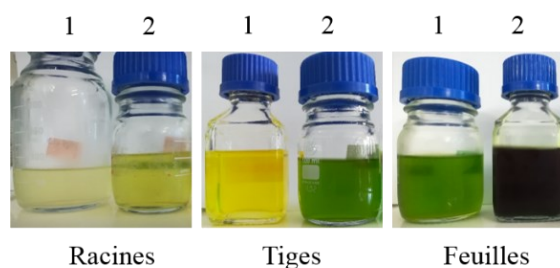
<sup>24</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 1.3.2.1

**III-5).** Ces rendements sont globalement plus faibles pour les solvants les plus apolaires comme l'heptane et l'acétate d'éthyle et plus élevés pour les solvants les plus polaires comme l'eau et le mélange éthanol/eau (60/40, v/v) quel que soit l'organe. Concernant les différents organes, les rendements pour les extraits de feuilles et de fleurs sont globalement plus élevés que ceux des extraits de racine et de tiges, ces deux organes seraient donc plus riches en composés extractibles avec les solvants utilisés.

**Tableau III-5 – Rendements d'extraction (% , m/m) en fonction des solvants utilisés et de la matrice étudiée.**

Solvant d'extraction	Organes de la plante				Suspensions cellulaires
	Racines	Tiges	Fleurs	Feuilles	
Heptane	0,57	2,25	10,37	3,60	/
Acétate d'éthyle	1,01	1,95	10,49	9,11	/
Isopropanol	0,90	1,63	20,00	13,14	/
Éthanol	3,37	4,22	19,26	15,11	6,00
Éthanol/Eau (60/40 ; v/v)	24,73	30,70	32,13	27,12	/
Eau	21,28	25,62	25,17	11,52	/

Les différences de couleurs obtenues pour les extraits en fonction des organes et des solvants d'extraction indiquent des différences de compositions phytochimiques. Par exemple, les extraits de racines sont beaucoup plus clairs que les extraits de feuilles, les racines ne contenant pas de chlorophylles (**figure III-18**).



**Figure III-18 – Extraits heptane (1) et acétate d'éthyle (2) de racines, tiges et feuilles d'IGR avant évaporation du solvant d'extraction.**

### **3.2 Activité des différents extraits :**

#### **3.2.1 Inhibition de la germination :**

L'activité antigerminative des différents extraits obtenus avec chaque solvant d'extraction et chaque organe a été évaluée grâce à la méthode en plaque 96 puits décrite dans le chapitre 2. La plante cible utilisée pour ces mesures d'activité est le cresson. Chaque extrait

a été testé à deux concentrations : 20 mg/mL et 5 mg/mL<sup>25</sup>. La concentration effective dans les puits est de 6,67 mg/mL pour une solution à 20 mg/mL d'extrait et de 1,67 mg/mL pour une solution à 5 mg/mL et équivaut à une quantité déposée par puits de 0,4 mg et 0,1 mg respectivement. La concentration la plus haute permet de visualiser une activité même si elle est faible alors que la concentration la plus basse permet de mettre en avant les extraits les plus actifs. L'activité des extraits a également été comparée à celle de la lawsone témoin positif de l'étude. Une molécule est considérée comme d'intérêt pour une application bioherbicide si elle est active à une concentration inférieure à 10<sup>-4</sup> mol/L (Dayan et al., 2000), néanmoins les extraits étant des mélanges de plusieurs molécules leur activité est plus complexe à évaluer, mais la comparaison avec la lawsone permettait d'avoir un point de comparaison. Plusieurs témoins négatifs sont également réalisés : un témoin de germination et un témoin permettant d'évaluer la toxicité des solvants dans lesquels ont été resolubilisés les extraits pour le test (**tableau III-6**).

Les résultats pour la **concentration des extraits à 20 mg/mL** sont présentés dans le **tableau III-6**. Tout d'abord, les témoins négatifs permettent d'obtenir un taux de germination des graines de cresson entre 80 et 100 %, comparable aux taux obtenus dans les études de potentiel alléopathique utilisant le cresson comme plante cible, ce qui indique que les solvants dans lesquels sont resolubilisés les extraits pour le test n'ont pas d'impact sur la germination. Le taux de germination des témoins négatifs dans les plaques testées avec 20 mg/mL d'extraits de fleurs était néanmoins plus faible ce qui peut indiquer potentiellement la présence de composés volatils dans la plaque 96 puits qui inhiberaient la germination des graines alentours. Concernant le témoin positif, la lawsone utilisée à 0,25 mg/mL (= 1,43 mmol/L) a inhibé la germination des graines de cresson, de 70 à presque 100%.

Tous les extraits de feuilles et de fleurs ont complètement inhibé la germination des graines de cresson. Les extraits de racines ont permis eux aussi d'inhiber quasi-totalement la germination des graines de cresson sauf pour l'extrait aqueux permettant d'obtenir un taux de germination de près de 40%. L'extrait à l'isopropanol de racines n'a pas été testé à 20 mg/mL à cause de son très faible rendement (0,90 % - **tableau III-5**). Concernant les extraits de tiges, les extraits à l'acétate d'éthyle, à l'isopropanol et à l'éthanol ont permis une inhibition totale de la germination, les autres solvants quant à eux ont permis à plus de 50 % des graines de cresson de germer.

A cette concentration, les organes les plus actifs sont donc les fleurs et les feuilles quel que soit le solvant d'extraction utilisé.

---

<sup>25</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 1.3.2.2

**Tableau III-6 – Taux de germination moyen (erreur type de la moyenne) des graines de cresson en fonction des extraits obtenus par les différents solvants pour les 4 organes de l'IGR, testés à 20 mg/mL, 12 graines par plaque 96 puits, 3 plaques par condition. (En vert les extraits ayant une activité comparable à celle de la lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination pour un organe donné selon le test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ .**

Solvant d'extraction	Organes de la plante				Suspensions
	Racines	Tiges	Fleurs	Feuilles	
Heptane	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	83,3 (4,8) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	/
Acétate d'éthyle	2,8 (2,8) <sup>b</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	/
Éthanol	2,8 (2,8) <sup>b</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	2,8 (2,8) <sup>c</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	91,7 (0,0)
Éthanol/eau	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	61,1 (7,3) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	/
Eau	38,9 (2,8) <sup>b</sup>	55,6 (10,0) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	/
Isopropanol	/	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>	/
Lawsone	30,6 (2,8) <sup>b</sup>	11,1 (2,8) <sup>b</sup>	2,8 (2,8) <sup>c</sup>	8,3 (4,8) <sup>b</sup>	/
Contrôle germination	86,1 (2,8) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	44,4 (7,3) <sup>bc</sup> 94,4 (5,5) <sup>a</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	/
Contrôle solvant isopropanol	83,3 (0,0) <sup>a</sup>	94,4 (2,8) <sup>a</sup>	41,7 (12,7) <sup>bc</sup> 80 (12,1) <sup>ab</sup>	83,3 (0,0) <sup>a</sup>	83,3 (0,0)

L'activité antigermineuse des extraits a ensuite été évaluée à une **concentration plus faible de 5 mg/mL (Tableau III-7)**. Les extraits de fleurs présentaient toujours l'activité antigermineuse la plus intéressante. En effet, à 5 mg/mL tous les extraits exceptés celui à l'isopropanol permettaient d'inhiber totalement la germination des graines de cresson. Concernant les autres organes de la plante, on observait une inhibition très forte de la germination pour les extraits à l'acétate d'éthyle et éthanolique de racines et de feuilles, mais une activité moindre pour les extraits de ces organes obtenus avec les autres solvants, les extraits à l'heptane et aqueux étant les moins actifs. Les extraits de tiges avaient la plus faible activité en comparaison avec les extraits des autres organes testés.

L'activité de l'extrait éthanolique de suspensions cellulaires a été testée comme pour les autres extraits à deux concentrations (20 mg/mL et 5 mg/mL) et les résultats obtenus sont les suivants. Le taux de germination des graines de cresson en contact avec l'extrait de suspensions cellulaires à 20 mg/mL est de  $92 \pm 0 \%$  et à 5 mg/mL est de  $92 \pm 5 \%$ . L'extrait éthanolique de suspensions cellulaires n'a donc pas d'effet sur la germination des graines de cresson.



Ces comparaisons d'activité ont été réalisées dans le but de cibler un ou deux solvants d'extraction et un ou deux organes les plus intéressants afin de poursuivre les investigations et d'identifier les molécules responsables de l'activité. Pour cela, il était nécessaire d'avoir une quantité suffisante d'extrait. Aux vues du rendement d'extraction plus élevé et de l'activité intéressante qu'il présente, l'extrait éthanolique de feuilles sera analysé plus en détail dans la suite du manuscrit.

**Tableau III-7 – Taux de germination moyen (erreur type de la moyenne) des graines de cresson en fonction des extraits de différentes polarités des organes d'IGR testés à 5 mg/mL. 12 graines par plaques 96 puits, 3 plaques par condition. (En vert les extraits ayant une activité comparable à celle de la lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ .**

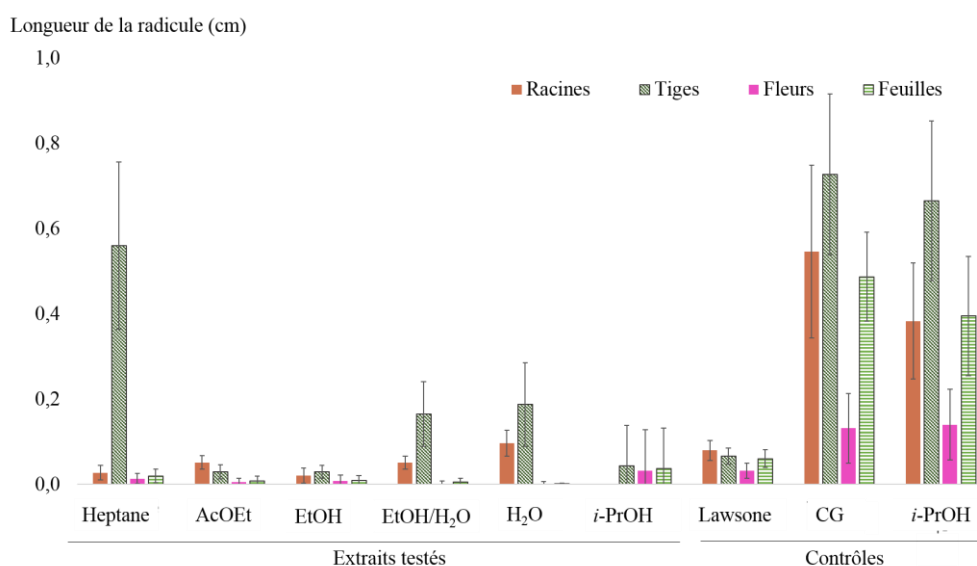
Solvant d'extraction	Organes de la plante				Suspensions
	Racines	Tiges	Fleurs	Feuilles	
Heptane	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	44,4 (10,0) <sup>c</sup>	/
Acétate d'éthyle	2,8 (2,8) <sup>b</sup>	52,8 (2,8) <sup>b</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	5,5 (2,8) <sup>d</sup>	/
Éthanol	16,7 (4,8) <sup>b</sup>	55,5 (7,3) <sup>ab</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	8,3 (4,8) <sup>d</sup>	91,7 (4,8)
Éthanol/eau	83,3 (4,8) <sup>a</sup>	88,9 (2,8) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	22,2 (2,8) <sup>cd</sup>	
Eau	94,4 (5,5) <sup>a</sup>	77,8 (7,3) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>c</sup>	47,2 (14,7) <sup>ab</sup>	/
Isopropanol	5,55 (5,5) <sup>b</sup>	16,7 (4,8) <sup>bc</sup>	33,33 (4,8) <sup>bc</sup>	8,3 (4,8) <sup>d</sup>	8,3 (4,8)
Lawsone	13,9 (5,5) <sup>b</sup>	13,9 (2,8) <sup>c</sup>	2,8 (2,8) <sup>c</sup>	5,5 (2,8) <sup>d</sup>	/
Contrôle germination	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	77,8 (5,5) <sup>a</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	/
Contrôle solvant EtOH	94,4 (2,8) <sup>a</sup>	88,9 (2,8) <sup>a</sup>	72,2 (5,5) <sup>ab</sup>	88,9 (2,8) <sup>a</sup>	/
Contrôle solvant isopropanol	86,11 (2,8) <sup>a</sup>	91,66 (4,8) <sup>a</sup>	91,66 (4,8) <sup>a</sup>	83,3 (0,0) <sup>ab</sup>	/

### 3.2.2 Inhibition de l'élongation racinaire :

Le taux de germination a été évalué et a permis d'identifier les extraits les plus actifs. Les longueurs des racicules ont également été mesurées en suivant le même protocole que dans le chapitre 2 pour étudier l'impact des extraits d'IGR sur l'élongation racinaire. En effet, comme pour le glyphosate, certains extraits pourraient ne pas avoir d'impact sur la germination mais sur la croissance racinaire.

A 20 mg/mL, les longueurs de racicules étaient comprises entre 0,4 et 0,7 cm pour les contrôles négatifs. Lors de l'évaluation de l'activité phytotoxique des extraits de fleurs, les contrôles négatifs correspondants ont montré une diminution de la longueur des racicules comparés à ceux observés lors des tests avec les autres organes de la plante. La lawsone à 0,25 mg/mL inhibait quant à elle la croissance racinaire (longueur moyenne inférieures à 0,1 cm ce qui correspondait au taux de germination faible des graines de cresson en présence de lawsone. Les extraits de racines, de fleurs et de feuilles ont eu le même impact que la lawsone sur la croissance des racicules. Les extraits à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol de tiges ont également eu le même impact que la lawsone sur la croissance des racicules. En revanche, les extraits hydroalcoolique et aqueux ont permis une croissance relativement importante des racines et l'extrait à l'heptane a permis une élongation racinaire similaire à celle obtenue en conditions contrôles (**figure III-19**).

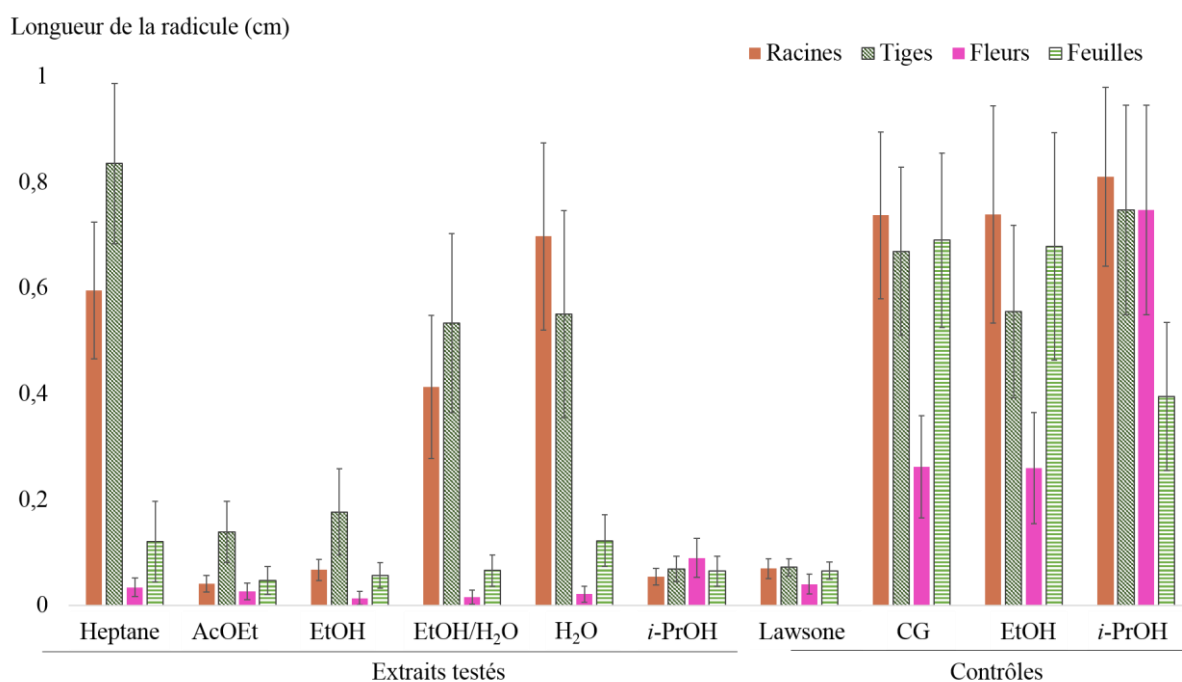
L'extrait éthanolique de suspensions cellulaires induit quant à lui une longueur moyenne de  $0,41 \pm 0,12$  cm, équivalente à celle des contrôles négatifs.



**Figure III-19 – Longueur de la racicule des graines de cresson en présence d'extraits d'IGR à 20 mg/mL, de lawsone et de solvants de resolubilisation (*i*-PrOH). CG : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la longueur des racicules des graines de 3 plaques (12 graines par conditions et par plaque)  $\pm$  erreur type de la moyenne**

Pour les extraits testés à 5 mg/mL, les longueurs des racicules pour les contrôles négatifs sont comprises entre 0,4 et 0,8 cm comme pour les tests avec les extraits à 20 mg/mL, les contrôles négatifs des extraits de fleurs ont une taille de racicule plus faible (environ 0,3 cm) comme observé précédemment, peut-être à cause de composés actifs volatils dans ces extraits de fleurs. La lawsone à 0,25 mg/mL conduit à une taille de racicules inférieure à 0,1 cm (**figure III-20**).

Concernant les extraits d'IGR, comme précédemment les extraits de fleurs et de feuilles étaient ceux qui inhibaient le plus la croissance racinaire avec une activité similaire à celle de la lawsone. L'activité des extraits de racines et de tiges était plus dépendante du solvant utilisé. En effet, les extraits à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol avaient une activité sur la longueur des racines similaires à celle observée pour les autres extraits, en revanche, les extraits à l'heptane, hydroalcoolique et aqueux avaient des activités similaires à celles obtenues avec les contrôles négatifs (longueurs de radicules comprises 0,4 cm et 0,8 cm). L'extrait éthanolique de suspensions cellulaires avait, là encore, une activité équivalente aux contrôles sur la germination des graines de cresson avec une longueur moyenne de  $0,55 \pm 0,19$  cm.



**Figure III-20 – Longueur de la radicule des graines de cresson en présence d'extraits d'IGR à 5 mg/mL, de lawsone et de solvants de resolubilisation (i-PrOH et EtOH) CG : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la longueur des radicules des graines de 3 plaques (12 graines par conditions et par plaque)  $\pm$  erreur type de la moyenne**

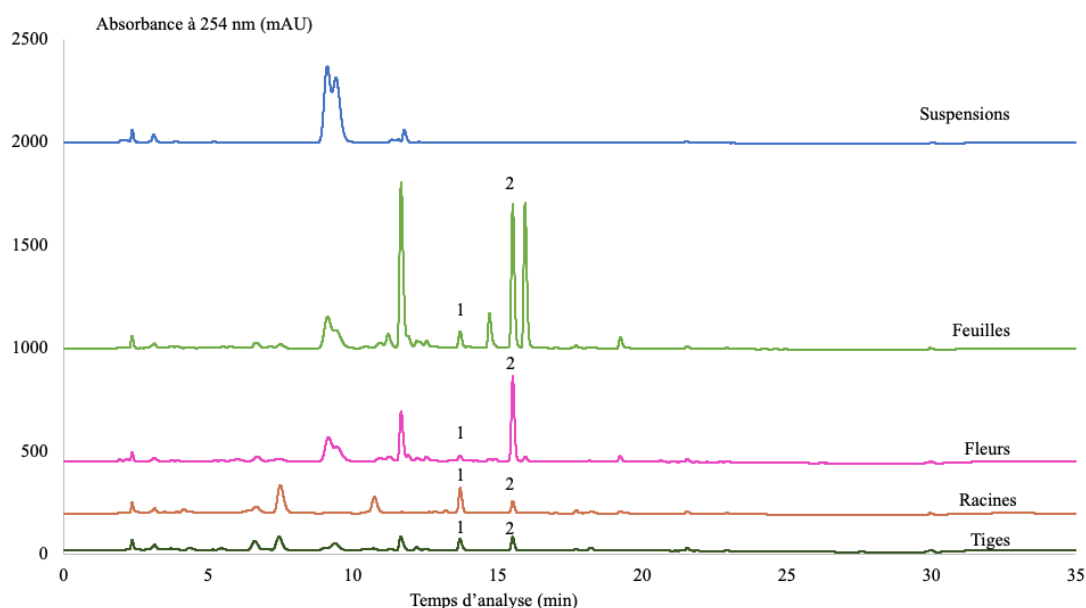
### 3.2.3 Profil phytochimique des extraits éthanoliques des différentes parties de la plante et des suspensions cellulaires :

Le profil phytochimique des extraits éthanoliques des 4 organes et des suspensions a été réalisé en utilisant la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) couplée à une détection UV-Visible grâce à un détecteur à barrettes de diodes.

Les chromatogrammes des extraits des différents organes et des suspensions sont présentés à la **figure III-21** et ont été obtenus avec le gradient 1 <sup>26</sup>. Les 4 extraits présentent des

<sup>26</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 2.1

pics visibles entre 2 et 23 minutes. Certains pics sont communs à plusieurs extraits, mais l'extrait de feuilles est celui qui présente les pics les plus intenses à 254 nm pour une même concentration.

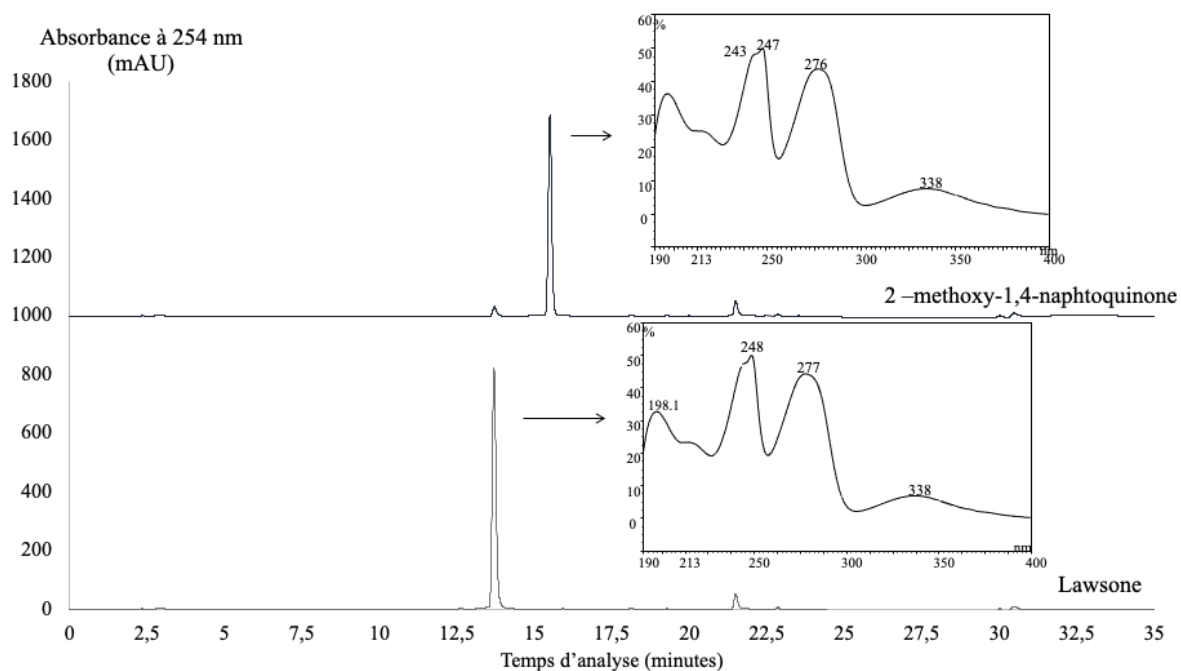


**Figure III-21 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des extraits éthanoliques de feuilles, fleurs, racines, tiges et suspensions cellulaires d'IGR par HPLC-DAD (gradient 1), (1) : lawsone, (2) : 2-MNQ.**

Le pic le plus intense de l'extrait de feuilles avec un temps de rétention de 11,6 minutes semble correspondre à un polyphénol car ses maxima d'absorbance sont de 267 nm et 350 nm. Il est présent dans les extraits de feuilles, fleurs et tiges mais pas dans celui des racines.

Concernant l'extrait de suspensions cellulaires, 2 pics intenses coélus sont observables avec un temps de rétention entre 9 et 10 minutes. D'autres pics moins intenses sont observables aux temps de rétention de 2, 3 et 12 minutes (**figure III-21**). L'extrait de suspensions semble être beaucoup moins riche que les extraits d'organes de la plante récoltée. En effet, en culture végétale *in vitro*, les conditions étant contrôlées, les cellules ont peu ou pas besoin de produire de métabolites spécialisés. Cette composition phytochimique pauvre peut également expliquer l'absence d'activité de l'extrait de suspensions même à 20 mg/mL. De plus, cet extrait ne semble pas contenir les 2 naphthoquinones décrites dans la plante (lawsone et 2-MNQ). Pour augmenter le potentiel antigerminatif des suspensions cellulaires, une étape d'élicitation serait nécessaire, en effet, en mimant un stress, les voies de biosynthèse des composés d'intérêt peuvent être activées. Sakunphueak et Panichayupakaranant (2010) ont par exemple utilisé du méthyl jasmonate pour augmenter la concentration intra ou extracellulaire de lawsone et de 2-MNQ dans les cultures de racines d'*Impatiens balsamina* L..

Les naphthoquinones étant connues pour leurs propriétés antigerminatives, la lawsone et la 2-méthoxy-1,4-naphthoquinone, déjà décrites dans la plante (Lobstein *et al.*, 2001) ont été injectées à une concentration de 0,2 mg/mL (**figure III-22**)<sup>27</sup> en utilisant le gradient de phase mobile utilisé pour les extraits ce qui a permis d'identifier leurs pics respectifs. Ces deux naphthoquinones ont des spectres UV avec des maxima d'absorbance caractéristiques (247-248, 276-277 et 335-340 nm) et ont des temps de rétention de 13,7 minutes pour la lawsone et de 15,5 minutes pour la 2-méthoxy-1,4-naphthoquinone. Elles correspondent respectivement aux pics (1) et (2) sur la **figure III-22**.



**Figure III-22 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) de la lawsone et de la 2-MNQ par HPLC-DAD (gradient 1), encadré spectre d'absorbance UV**

Des gammes étalons de ces 2 naphthoquinones ont été réalisées pour avoir une estimation de la concentration en lawsone et en 2-MNQ présentes dans les extraits des différentes parties de la plante. Ces gammes étaient constituées de 6 points de gamme allant de 0,0025 mg/mL à 0,25 mg/mL<sup>28</sup>. Elles ont été réalisées en représentant les aires sous les pics de la lawsone et de la 2-MNQ en fonction de la concentration et en déterminant l'équation de la droite.

L'extrait de feuilles contient la concentration la plus élevée en 2-MNQ, suivi par l'extrait de fleurs, puis de racines et enfin de tiges (**tableau III-8**). La concentration en lawsone est plus faible, les racines en étant cette fois-ci les plus riches, suivie des feuilles, des tiges, puis des fleurs qui en contiennent très peu.

<sup>27</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 2.1

<sup>28</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 2.1

L'activité de la lawsone et de la 2-MNQ a été évaluée sur les graines de cresson dans le chapitre 2, ces deux molécules inhibaient la germination des graines à partir de 0,5 mmol/L dans les puits ce qui correspondait à des concentrations de 0,087 mg/mL pour la lawsone et 0,094 mg/mL pour la 2-MNQ. La concentration de lawsone calculée dans les extraits des différents organes (**tableau III-8**) est plus faible que celle à partir de laquelle l'activité avait été détectée précédemment, il peut donc être supposé que la lawsone ne participe pas seule à l'activité des extraits.

En revanche, la concentration de 2-MNQ est deux fois supérieure dans les extraits de feuilles et légèrement supérieure dans l'extrait de fleurs d'IGR à la concentration à partir de laquelle une activité a été détectée dans le chapitre 2, laissant supposer que la 2-MNQ participe bien à l'activité dans ces extraits. Néanmoins, dans les extraits de tiges et de racines la concentration est presque dix fois plus faible que précédemment et les extraits de tiges n'ont pas montré d'activité alors que les extraits de racines ont montré une activité à 5 mg/mL. D'autres molécules semblent donc participer à l'activité des extraits racinaires ou alors il existe des phénomènes de synergie entre molécules actives.

Ainsi, ces naphthoquinones participent sûrement à l'activité de ces différents extraits éthanoliques, mais d'autres molécules peuvent être également impliquées. Pour visualiser l'impact de ces naphthoquinones sur l'activité, il serait intéressant d'ajouter de la lawsone et de la 2-MNQ aux extraits ou au contraire de retirer ces composés par fractionnement pour vérifier l'activité des extraits ainsi appauvris sur la germination des graines de cresson.

**Tableau III-8 – Concentration de la lawsone et de la 2-MNQ dans les extraits éthanoliques des différentes parties de l'IGR (injection de 5µL à 5 mg/mL)**

Concentration(mg/mL)	Feuilles	Tiges	Racines	Fleurs
Lawsone	0,0141	0,0093	0,0204	0,0033
2-MNQ	0,1826	0,0149	0,0131	0,1055

Afin de vérifier l'implication de ces deux naphthoquinones dans l'activité de l'IGR et de mettre en évidence les composés responsables de l'activité antigerminative des extraits, un microfractionnement couplé à la détection de l'activité bioherbicide a été effectué.

### **3.2.4 Microfractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique de feuilles :**

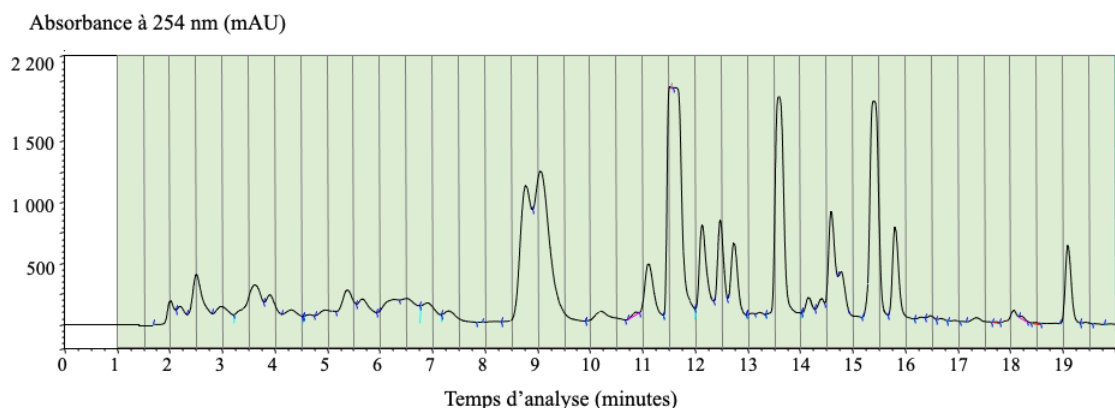
#### **3.2.4.1 Activité antigerminative des microfractions :**

Pour identifier la ou les molécules actives, un microfractionnement a été réalisé sur l'extrait éthanolique de feuilles, à cause de son activité et de la forte biodisponibilité des feuilles par rapport aux fleurs. Les fractions ont été collectées directement en plaque 96 puits après

passage dans la colonne à un débit de 0,3 mL/min. Ces fractions ne faisant que quelques centaines de microlitres, elles ont été qualifiées de microfractions dans la suite de ce chapitre.

Vingt  $\mu\text{L}$  d'extrait éthanolique de feuilles d'IGR à une concentration de 20 mg/mL ont été injectés, ce qui correspond à une masse de 0,4 mg d'extrait injecté. Après séparation, l'extrait a été collecté en 38 fractions dans un intervalle de temps de rétention entre 1 et 20 minutes, ce qui correspondait à la zone du chromatogramme où des pics étaient visibles. En considérant que chaque fraction aurait une masse collectée équivalente, cela correspondrait à une masse moyenne de fraction collectée par puits de 0,010 mg et à une concentration de **0,18 mg/mL** dans chaque puits. La lawsone a une activité inhibant 50 % de la germination des graines de cresson à partir de 0,5 mM, ce qui correspond à **0,087 mg/mL**. La concentration moyenne calculée de chaque microfraction est théoriquement suffisante pour détecter l'activité des composés actifs présents dans l'extrait.

Le gradient choisi pour le microfractionnement de l'extrait était le même que celui utilisé pour l'obtention des profils par HPLC-UV et la collecte des fractions a été réalisée toutes les 30 secondes (**figure III-23**). Le test d'activité a été effectué directement après la collecte sur 2 plaques différentes sur lesquelles 2 collectes ont été réalisées. 38 fractions sont collectées au total par analyse chromatographique. Il y a donc 4 puits identiques pour chaque microfraction et donc 4 graines sur lesquelles est évaluée l'activité.



**Figure III-23 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR à 20 mg/mL, par HPLC – DAD (gradient 1). En vert la période sur laquelle les fractions ont été collectées. Les traits verticaux indiquent les limites de collecte entre les fractions.**

Le nombre de graines germées sur les 4 testées en présence de chaque microfraction est présenté dans la **figure III-24**. Les fractions 16 et 17 (en orange sur les **figures III-24 et III-25**) inhibent complètement la germination des graines de cresson alors que les fractions 14, 22, 27, 28, 30 et 37 (en bleu sur les **figures III-24 et III-25**) inhibent la germination de 3 graines sur 4. Les autres fractions permettent à plus de la moitié des graines de cresson de germer et n'ont pas été étudiées plus en détail pour la suite des analyses.

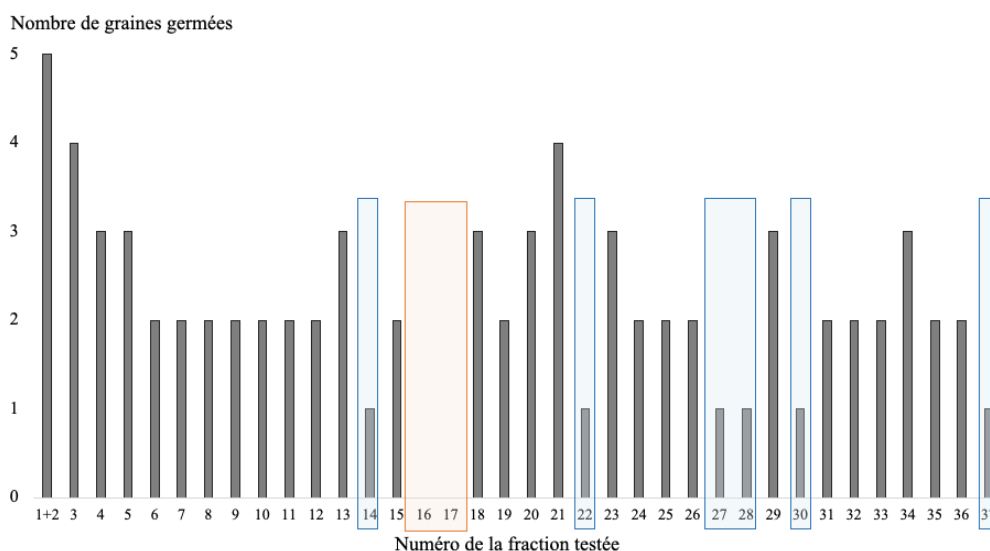


Figure III-24 – Nombre de graines germées par microfraction d'un extrait éthanolique de feuilles d'IGR, avec 4 graines par microfractions sauf pour la fraction 1+2 pour laquelle 6 graines ont été testées.

### 3.2.4.2 Identification des molécules présentes dans les fractions actives :

Pour identifier les molécules présentes dans ces fractions, les microfractions ont été analysées individuellement en utilisant l'HPLC couplée à une détection UV<sup>29</sup> et les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la **figure III-25**. De plus, les fractions actives (en orange et en bleu sur le chromatogramme) contiennent des composés visibles sur le chromatogramme à 254 nm. Les spectres UV de ces pics ont ensuite été étudiés.

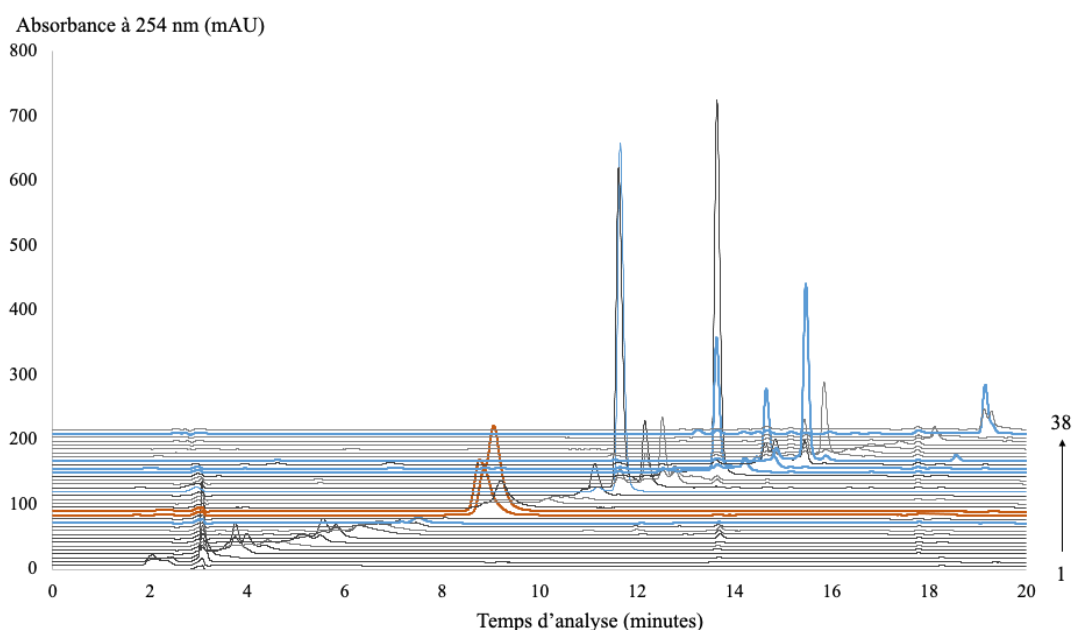
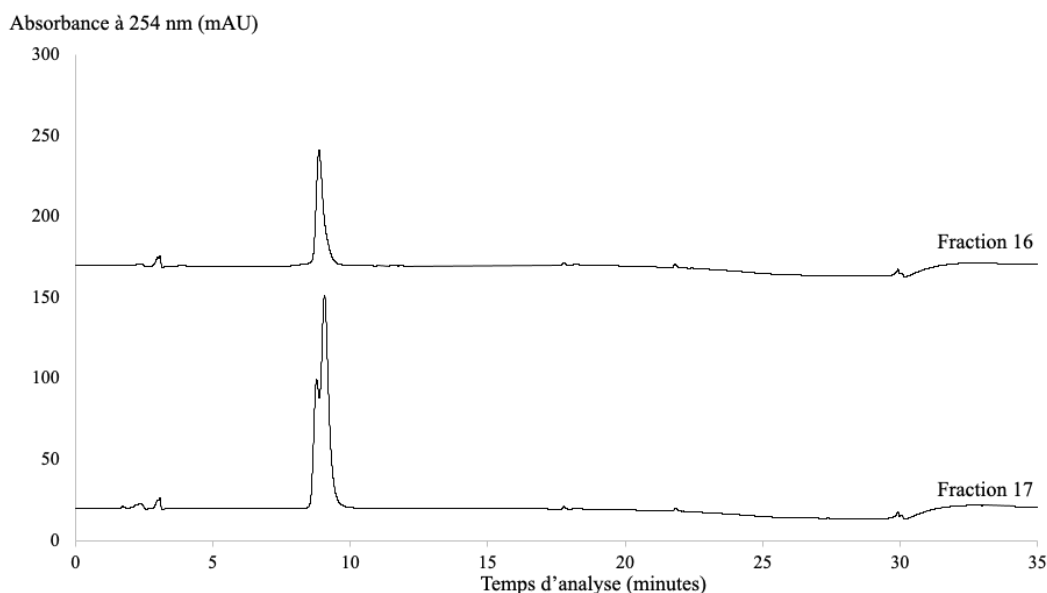


Figure III-25 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des différentes microfractions obtenues après fractionnement de l'extrait éthanolique d'IGR, par HPLC – DAD (gradient 1). En orange les fractions 16 et 17 et en bleu les fractions 14, 22, 27, 28, 30 et 37.

<sup>29</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 2.1

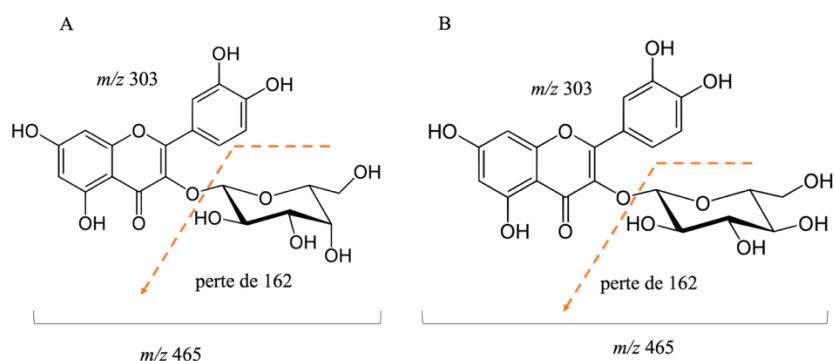


La **fraction 16** est enrichie en un composé ayant un temps de rétention de 8,8 minutes et des maxima d'absorbance dans l'UV à 255 et 355 nm, ce qui correspond à des valeurs caractéristiques des flavonoïdes. La **fraction 17** est enrichie en 2 composés de temps de rétention 8,8 minutes et 9,1 minutes, les maxima d'absorbance étant équivalents à ceux obtenus pour le composé de la fraction 16 (**figure III-26**).



**Figure III-26** – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des microfractions 16 et 17 par HPLC-DAD (gradient 1).

Une analyse par HPLC couplée à la spectrométrie de masse haute résolution<sup>30</sup> en utilisant le même gradient d'élution a été réalisée, ce qui a permis d'obtenir une proposition de formule brute de  $C_{21}H_{20}O_{12}$  et un profil de fragmentation qui pourrait correspondre à un noyau de quercétine portant un sucre de type hexose pour les 2 composés (**figure III-27**) (Raudone *et al.*, 2015)). Les 2 composés qui ont ce squelette de quercétine glycosylé peuvent donc correspondre à l'hyperoside (quercétine-3-O-galactoside) et à l'isoquercétine (quercétine-3-O-glucoside).



**Figure III-27** – Profil de fragmentation de l'hyperoside (A) et de l'isoquercétine (B) obtenu par HPLC-HRMS en mode d'ionisation positif.

<sup>30</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 2.3

Pour différencier ces 2 isomères, les standards disponibles au laboratoire ont été analysés en HPLC – UV afin de comparer leur temps de rétention à ceux obtenus pour les pics majoritaires des fractions collectées. L'hyperoside a un temps de rétention de 8,8 min et l'isoquercétine de 9,1 min. L'hyperoside est donc le composé présent dans la fraction 16 alors que l'isoquercétine est présente dans la fraction 17.

La présence de ces 2 molécules dans les parties aériennes d' IGR a déjà été démontré (Szewczyk, Zidorn, *et al.*, 2016) et l'isoquercétine est déjà connue pour son activité antigerminative sur les graines de laitue dont elle réduit la germination de 50 % à 0,3 mg/mL (Razavi *et al.*, 2009).

L'activité de ces 2 composés a donc été évaluée au laboratoire en utilisant le test en plaque 96 puits et l'hyperoside n'a pas montré d'activité antigerminative sur les graines de cresson : à une concentration de 0,25 mg/mL le taux de germination était de  $76 \pm 6$  % et à 0,05 mg/mL de  $87 \pm 2$  %. L'isoquercétine n'a pas montré d'activité à 0,05 mg/mL avec un taux de germination des graines de cresson de  $87 \pm 12$  %. Dans les deux fractions, la concentration de ces deux composés a été déterminée par étalonnage externe et sont inférieures à 0,01 mg/mL, ce qui indique **qu'ils ne semblent pas être responsables de l'activité observée dans les fractions 16 et 17** bien qu'étant les composés majoritaires observés en UV à 254 nm. D'autres analyses sont nécessaires pour identifier le ou les composés responsables de l'activité de ces fractions.

**Les autres fractions 14, 22, 27, 28, 30 et 37** ont ensuite été analysées pour déterminer leurs composés et identifier la ou les molécules porteuse(s) d'activité.

La **fraction 14** a été analysée en utilisant l'HPLC couplée à une détection UV, ce qui a permis de détecter un composé majoritaire à un temps de rétention de 7,4 minutes et qui avait des maxima d'absorbance à 236, 300 et 340 nm. Pour les fractions de 10 à 14, un pic est également présent à 13,7 minutes (en orange sur la **figure III-28**) qui correspond à la lawsone, toutefois, ces fractions correspondent à des temps de collecte compris entre 5 et 7,30 minutes d'analyse (**figure III-28**). Il n'est donc pas logique d'y trouver un composé ayant un temps de rétention plus élevé par rapport au moment de la collecte.

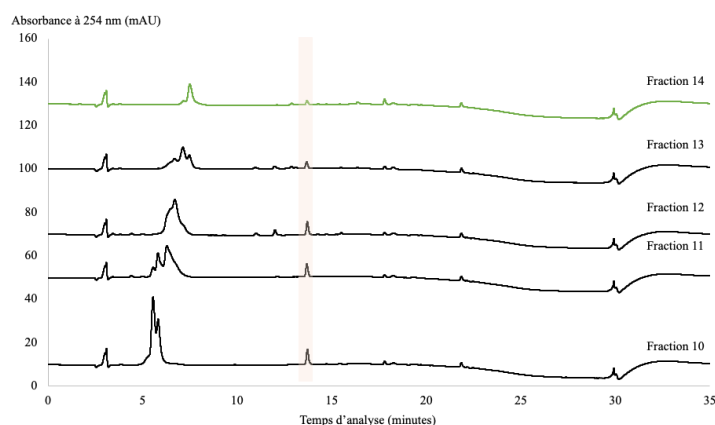


Figure III-28 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des microfractions 10, 11, 12, 13 et 14, par HPLC-DAD (gradient 1)

Les composés visibles sur les chromatogrammes ayant un temps de rétention entre 5 et 7 minutes pourraient être des formes tautomères de la lawsone. En effet, la lawsone peut être présente en solution sous plusieurs formes et le pH des phases mobiles utilisées n'a pas été mesuré (figure III-29). Ces formes tautomères seraient donc moins retenues sur la colonne C18 utilisée, en ayant par exemple des groupements hydroxyles à la place des groupements cétones présents en position 1 et 4 de la lawsone. Les variations de pH permettraient également de reformer de la lawsone détectable à 13,7 minutes. Néanmoins, la lawsone est très peu concentrée dans la fraction 14 et ne peut être responsable à elle seule de l'activité observée.

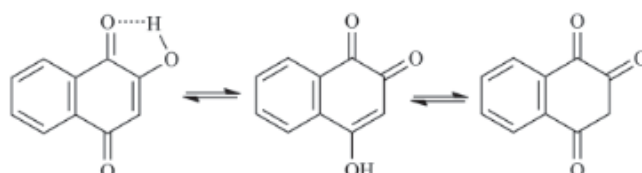
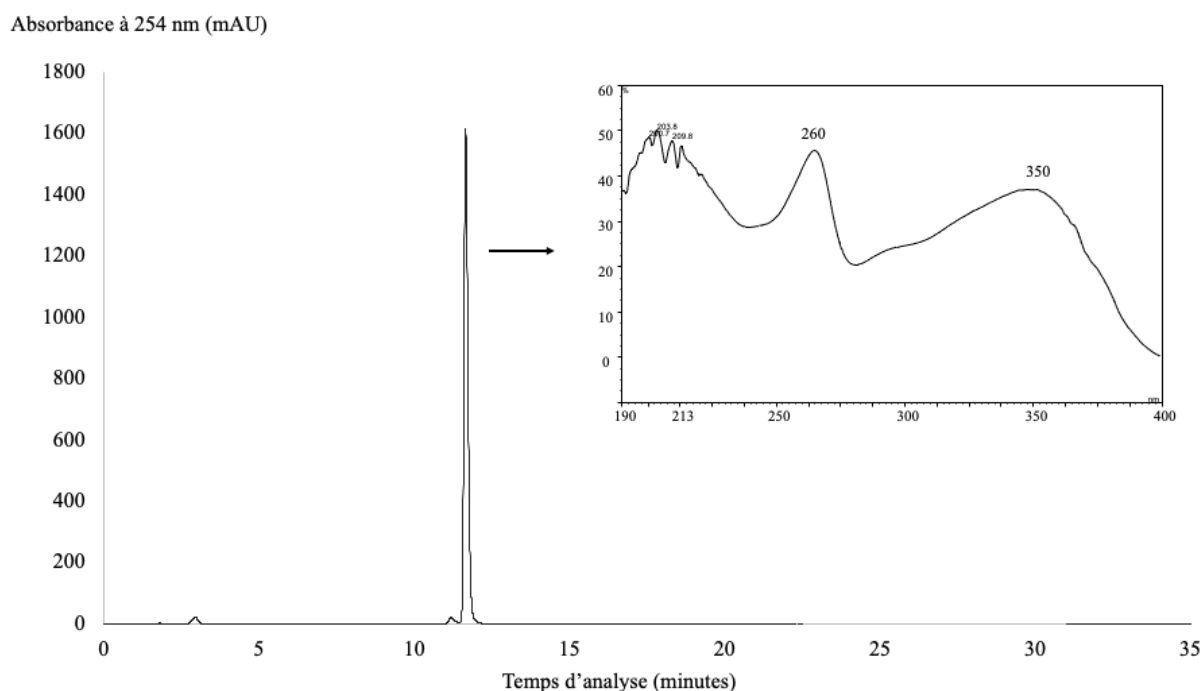


Figure III-29 – Formes tautomères de la lawsone (López López *et al.*, 2014)

La **fraction 22** est quant à elle constituée d'un pic majoritaire avec un temps de rétention à 11,65 minutes et des maxima d'absorbance UV à 260 et 350 nm caractéristiques d'un flavonoïde (figure III-30).



**Figure III-30 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la microfraction 22 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV du composé majoritaire.**

Après une analyse par HPLC-HRMS, la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{11}$  a pu être proposée avec une erreur de 6,8 ppm. Cette masse ainsi que le profil de fragmentation qui comporte une perte de sucre de 162 u et un squelette aglycone de  $m/z$  287,2553 (proposition de formule  $C_{15}H_{10}O_6$  avec une erreur de 7,2 ppm) suggère la présence de kaempférol glycosylé (**figure III-31**). Cette suggestion a été confirmée suite à l'analyse d'une solution de kaempférol-3-O-glucoside qui a permis de confirmer le temps de rétention et spectre UV obtenus pour la fraction 22. De plus, ce composé correspond au pic majoritaire de l'extrait de feuilles d'IGR qui a déjà été décrit par Szewczyk (2018). Dans l'étude de Jun *et al.* (2011), du kaempférol 3-O-D-glucoside isolé de *Solidago canadensis* L. (solidage du Canada) a inhibé la croissance de la partie aérienne de graines germées d'*Echinochloa colonum* L. à partir de 15  $\mu\text{g/mL}$ , en revanche aucun effet n'a été visualisé sur la croissance racinaire. Pour confirmer que ce composé est bien responsable de l'activité visualisée, l'évaluation de l'activité de l'étalon de référence ainsi la détermination de sa concentration dans la fraction sont nécessaire.

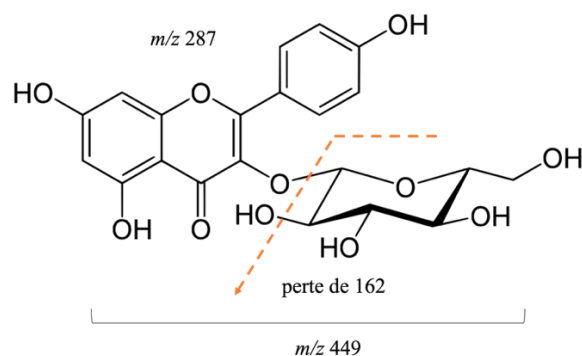


Figure III-31 – Profil de fragmentation du kaempférol-3-O-glucoside obtenu par HPLC – HRMS en mode positif.

Les **fractions 27 et 28** ont montré une activité sur la germination des graines de cresson. Lors de l'analyse HPLC, les fractions 27 et 28 ont montré la présence de lawsone (**figure III-32**) au temps de rétention 13,8 minutes. La lawsone est également présente dans la fraction 26 de façon plus intense, bien que cette fraction ait montré une activité antigerminative moindre que celle des fractions 27 et 28. Les concentrations en lawsone dans les fractions lors de l'évaluation de l'activité de ces dernières ont été calculées et sont respectivement de 0,026; 0,0089 mg/mL pour les fractions 26 et 27. Pour la fraction 28, la concentration de lawsone est inférieure à 0,0025 mg/mL. La concentration de lawsone dans ces fractions est inférieure à la concentration minimale pour laquelle l'activité de la lawsone a été observée dans le chapitre 2 (0,087 mg/mL). La lawsone ne peut donc être seule responsable de l'activité observée pour ces fractions.

Dans la **fraction 27**, un deuxième composé (**figure III-32**) est présent à un temps de rétention de 14,3 minutes et présente des maxima d'absorbance similaires à ceux de la lawsone et caractéristiques d'une naphtoquinone.

Dans la **fraction 28**, un troisième composé est présent en plus des 2 composés décrits précédemment, à un temps de rétention de 14,6 minutes. Les maxima d'absorbance pour ce composé sont de 287 et 360 nm (**figure III-32**). Ainsi les composés minoritaires de l'extrait présents dans les fractions 27 et 28 pourraient être à l'origine de l'activité observée.

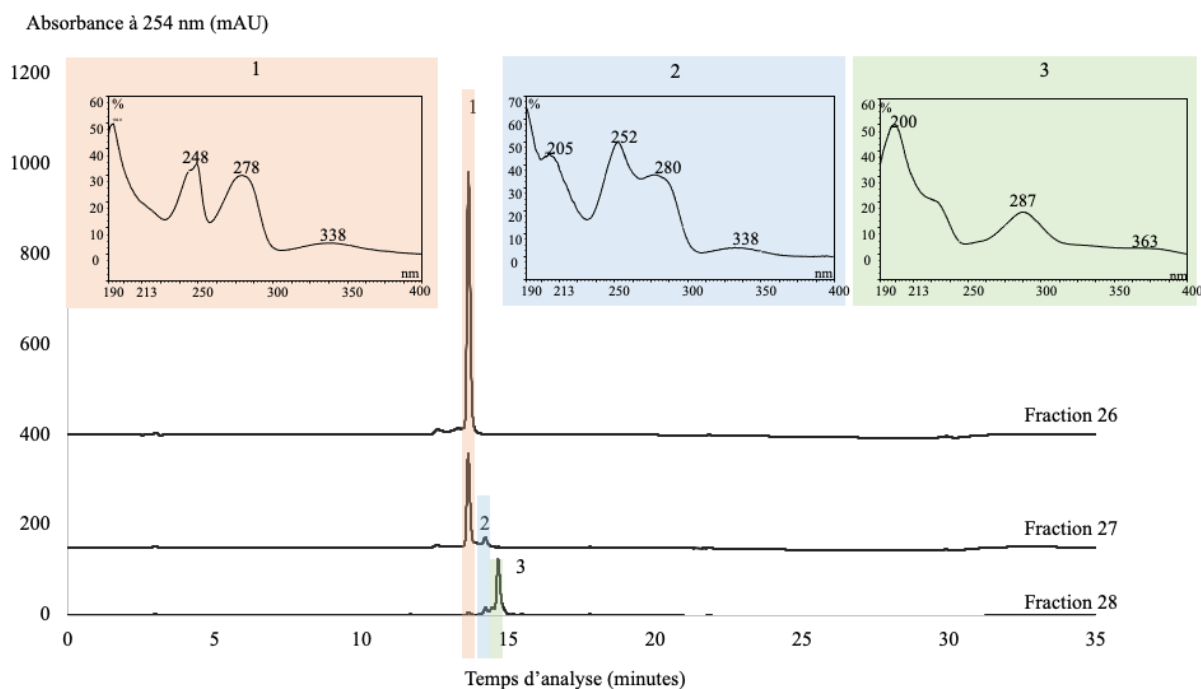


Figure III-32 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des microfractions 26, 27 et 28 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV des composés 1, 2 et 3.

La **fraction 30** est enrichie en un composé qui a un temps de rétention de 15,5 minutes dont les maxima d'absorbance en UV sont 247, 280 et 335 nm ce qui correspond à la 2-MNQ (**figure III-33**). La concentration en 2-MNQ dans la fraction a été calculée et est de 0,053 mg/mL ce qui est inférieur à la concentration de 0,097 mg/mL pour laquelle l'inhibition de la germination des graines de cresson était visible. La 2-MNQ peut donc participer à l'activité de cette fraction mais n'est pas la seule molécule active.

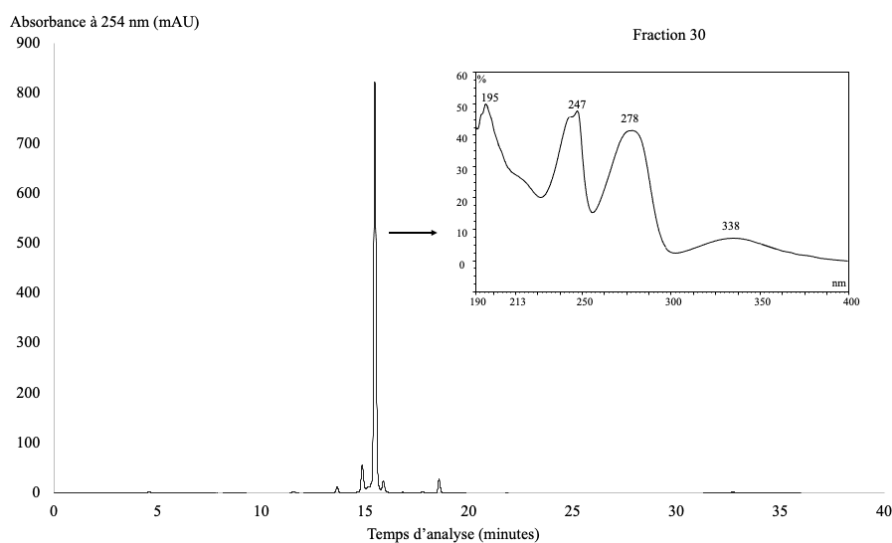
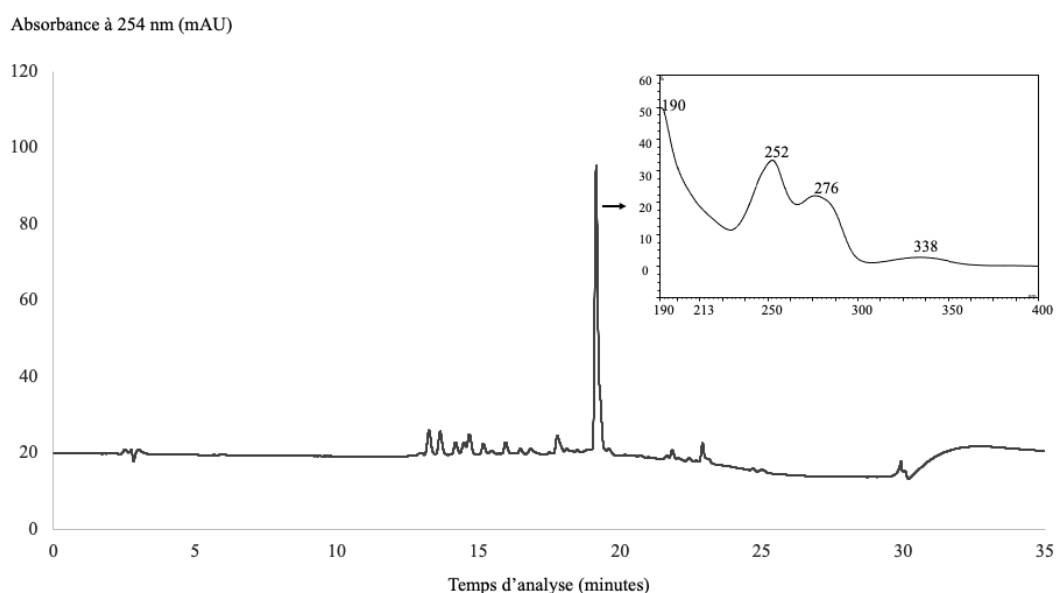


Figure III-33 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la microfraction 30 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV du composé majoritaire

La **fraction 37** est enrichie en un composé qui a un temps de rétention de 19,1 minutes. Ce composé a des maxima d'absorbance UV à 252,3 276 et 335 nm proches de ceux caractéristiques des naphtoquinones (**figure III-34**).

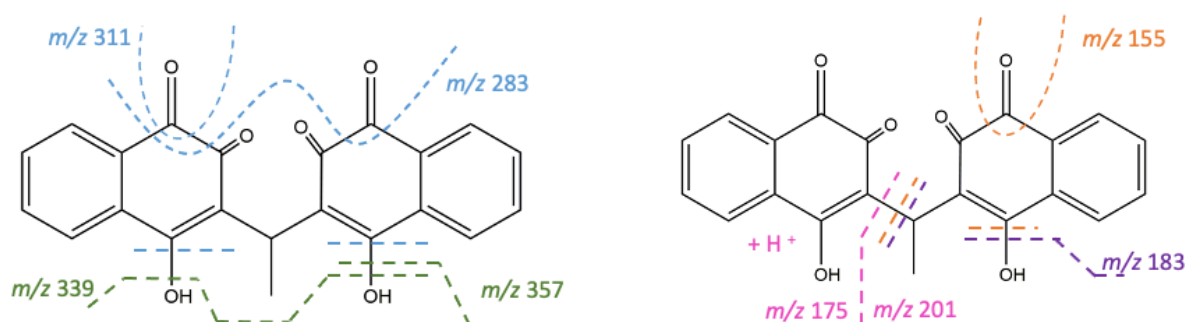


**Figure III-34 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la microfraction 37 avec le gradient 1 par HPLC-DAD (gradient 1) et spectre UV du pic majoritaire**

Après une analyse par HPLC-HRMS, le rapport  $m/z$  du pic à 19,1 minutes est de 375,0839 avec un profil de fragmentation contenant les fragments 276,1578 et 175,0380 ce qui a permis d'avoir une proposition de formule brute  $C_{22}H_{14}O_6$  (6,5 ppm d'erreur). Cette proposition de formule brute pourrait correspondre à l'impatienol, une naphtoquinone déjà décrite dans le genre *Impatiens* ou à l'un de ses isomères. De plus, lors de l'analyse en spectrométrie de masse, des fragments ont pu être observés, ils sont listés dans le **tableau III-9**. L'impatienol pourrait se fragmenter de façon à produire les fragments observés selon le schéma de fragmentation proposé dans la **figure III-35**, ce qui appuie de façon favorable la proposition de ce composé comme présent dans la fraction 37. Ce composé, dont l'activité antigerminative n'a pas été décrite auparavant, pourrait participer à l'activité de la plante.

**Tableau III-9 – Ions fragments obtenus lors de la fragmentation du composé majoritaire de la microfraction 37**

Ion fragments ( <i>m/z</i> )	Formule brute	$\Delta$ ppm
155,0489	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> O	1,4
175,0390	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	0,1
183,0434	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	3,7
201,0556	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	4,9
283,0736	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	6,2
311,0694	C <sub>21</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	2,9
339,0635	C <sub>22</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	4,9
357,0787	C <sub>22</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	8,4

**Figure III-35 – Schémas de fragmentation proposés de l'impatiénol**

### 3.2.5 Fractionnement par HPLC préparative :

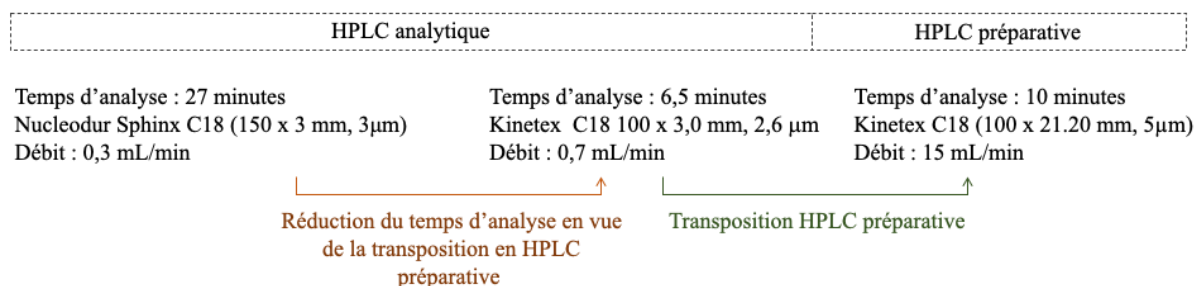
Après le microfractionnement, un fractionnement utilisant une HPLC préparative a été réalisé pour l'extrait éthanolique de feuilles d'IGR. L'HPLC préparative permet d'injecter une quantité d'extrait plus importante et d'obtenir des fractions plus conséquentes. Cette approche plus classique a été complémentaire au microfractionnement. Elle a permis de confirmer les zones actives du chromatogramme détectées précédemment avec le microfractionnement, d'obtenir de plus grandes quantités de fractions et de vérifier que des molécules un peu moins actives ou présentes ont plus faible quantité n'avaient pas été manquées. De plus, grâce à la plus grande quantité de composés obtenus dans les fractions, il était possible de faire des analyses complémentaires pour identifier des composés, comme par exemple de la Résonance Magnétique Nucléaire ou encore de refaire des tests d'activité plus poussés sur des molécules pures ce qui était impossible avec les faibles quantités de composé obtenues par microfractionnement.



### 3.2.5.1 Transposition du gradient analytique :

Des transpositions entre colonnes analytique et préparative sont possibles afin de reproduire la même séparation à une échelle plus grande.

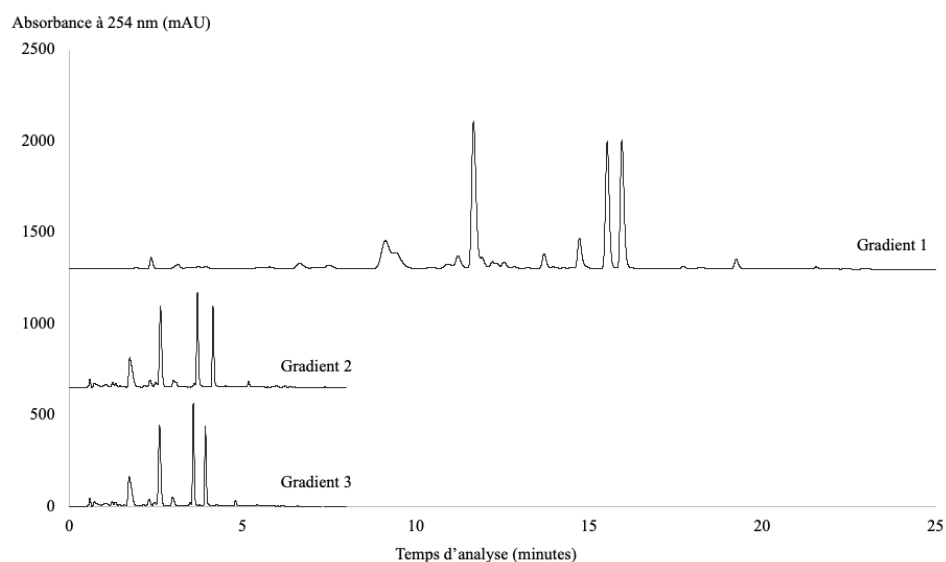
Au laboratoire CAMBAP, cette transposition a été développée entre une colonne analytique Kinetex C18 100 x 3,0 mm, 2,6 µm et une colonne préparative Axia C18 100x 21,20 mm, 5µm sur l'extrait éthanolique d'IGR.



**Figure III-36 – Étapes d'optimisation du gradient utilisé en HPLC analytique pour le fractionnement par HPLC préparative**

Il a donc tout d'abord fallu transposer la méthode développée précédemment sur une colonne nucléodur C18 150 x 3,0 mm, 3,0 µm sur une colonne Kinetex C18 de dimensions 100 mm x 3 mm, 2,6 µm<sup>31</sup> pour ce faire l'outil HPLC Calculator v3.0 développé par le Dr Davy Guillaume de l'Université de Genève a été utilisé. A partir du gradient 1 sur 27 minutes, un gradient sur 6,5 minutes a été proposé et testé sur la séparation de l'extrait éthanolique de feuilles d'IGR (figure III-37 – Gradient 2). Le gradient a été allongé d'une minute pour permettre une meilleure séparation des pics visibles entre 3,5 et 4 minutes d'analyse en vue d'une collecte toutes les 30 secondes sur l'HPLC préparative (figure III-37 – Gradient 3). Le gradient 3 a été conservé pour la séparation et la collecte en HPLC préparative en utilisant cette fois-ci la colonne Axia Kinetex C18 de dimensions 100 x 21,20 mm, 5 µm, la période d'équilibrage d'une minute a été enlevée, la colonne étant préalablement équilibrée et les analyses sur la colonne préparative n'étant pas faites en série.

<sup>31</sup> Conditions expérimentales détaillées dans le chapitre VI – partie 2.2



**Figure III-37 – Chromatogramme (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR analysé par HPLC-DAD, avec le gradient 1 (colonne nucléodur C18 150 x 3,0 mm, 3,0 µm), le gradient 2 et le gradient 3 (colonne Kinetex C18 de dimensions 100 x 21,20 mm, 5 µm)**

### 3.2.5.2 Séparation et collecte par HPLC préparative :

L'échantillon a été solubilisé à 40 mg/mL (1mL injecté à un débit de 15 mL/min) dans un mélange correspondant aux conditions initiales utilisées en début de gradient (Eau + 0,1% acide formique / Acétonitrile (80/20 ; v/v)). La transposition n'a pas permis d'obtenir les mêmes pics qu'attendus après HPLC – analytique, une perte de résolution est visible dès le début du chromatogramme, mais les fractions collectées ont donné des résultats intéressants. Vingt fractions de 30 secondes ont été collectées (**figure III-38**), puis évaporées et enfin lyophilisées. La masse sèche collectée pour certaines fractions était nulle voire très légèrement négative indiquant qu'une infime quantité avait été collectée, seules les masses et les pourcentages représentatifs de chaque fraction ayant permis d'obtenir une masse positive ont été indiqués dans le **tableau III-10**. Le total des pourcentages des fractions ne correspond pas à 100%, mais plutôt à 60%. Cela peut être due à l'étape de resolubilisation lors de laquelle l'extrait a été filtré et une partie a été retenue par le filtre.

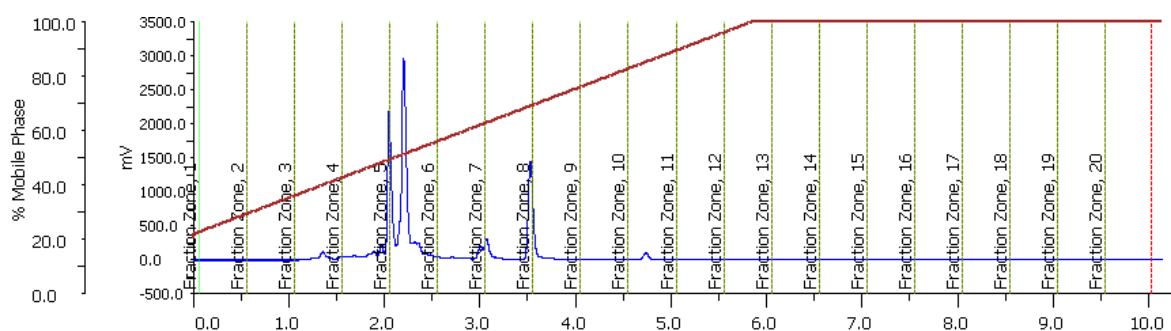


Figure III-38 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique d'IGR par HPLC préparative-UV (gradient 4).

Tableau III-10 – Rendement des fractions collectées après l'HPLC préparative (40 mg injectés).

Fraction	3	4	5	10	11	12	13	15	16	18	19	Total
Masse (mg)	1,9	2,1	2,1	1,4	1,9	3,1	2	3,3	4,8	0,8	1	24,4
Pourcentage de la fraction (%)	4,8	5,3	5,3	3,5	4,6	7,6	5	8,3	12	2	2,5	60,9

L'activité antigerminative des fractions <sup>27</sup> a été évaluée en utilisant le protocole développé dans le chapitre 2 sur les graines de cresson, en utilisant 3 graines par fractions en duplicat (sur 2 plaques 96 puits) (figure III-39). Un total de 6 graines par fraction a donc été utilisé. Le nombre de graines germées pour chaque fraction a été compté, les résultats sont résumés dans le tableau III-11.

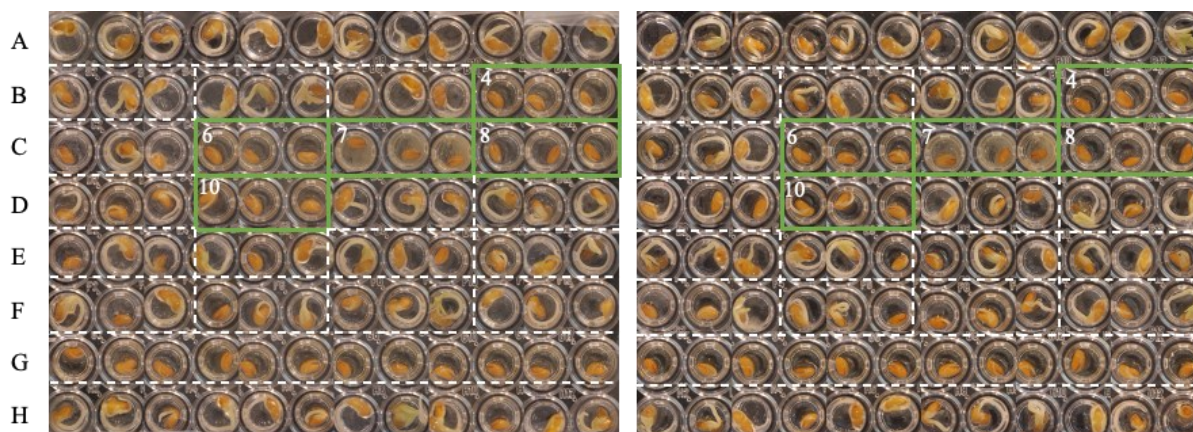


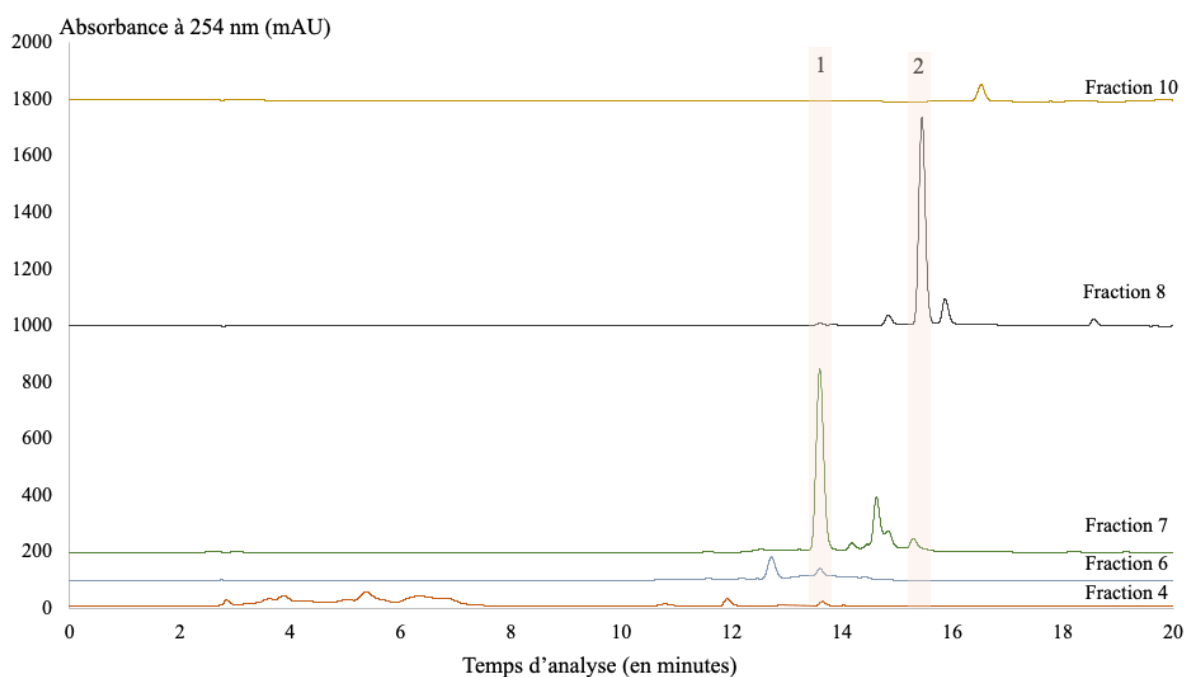
Figure III-39 – Test antigerminatif des 20 fractions de l'extrait de feuilles d'IGR collectées après HPLC – préparative. Lignes B-F : test des fractions (3 graines par fractions réalisé en duplicat). A : témoin négatif solvant (éthanol), G : témoin positif (lawsone à 0,083 mg/mL), H : témoin de germination. Encadrés verts : zones d'inhibition de la germination.

**Tableau III-11 – Nombre de graines germées pour chaque fraction collectée par HPLC préparative. Trois graines par plaque, en duplicat.**

Fraction	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20
Plaque 1	3	3	3	0	2	0	0	0	3	1	3	3	2	3	2	3	2	2	3	3
Plaque 2	3	3	3	0	3	0	0	0	3	2	2	3	3	3	2	3	2	2	3	2
Total	6	6	6	0	5	0	0	0	6	3	5	6	5	6	4	6	4	4	6	5

Sur les 20 fractions testées, 4 inhibaient complètement la germination des graines de cresson, les fractions 4, 6, 7 et 8. La fraction 10 inhibe 50 % de la germination des graines. Les autres fractions permettaient à plus de la moitié, voir à la totalité des graines de germer et n'ont donc pas été analysées de façon approfondie.

Les fractions ont ensuite été analysées par HPLC – UV avec le gradient 1 (**figure III-40**). Les fractions obtenues par HPLC préparative présentent plus de pics que celles obtenues par microfractionnement, indiquant un isolement moins fin des pics chromatographiques pour la plupart des fractions.



**Figure III-40 – Chromatogrammes UV (à 254 nm) des fractions obtenues avec l'HPLC préparative, (1) lawsone, (2) 2-MNQ par HPLC – DAD (gradient 1)**

Les **fractions 7 et 8** sont enrichies en naphtoquinones, notamment en lawsone pour la fraction 7 et en 2-MNQ pour la fraction 8 (pics n° 1 et 2).

Les fractions **6 et 4** contiennent également de la lawsone, mais en plus faible concentration (inférieure à 0,0025 mg/mL), ainsi que d'autres composés dont les pics sont visibles. L'activité observée est donc due à d'autres composés qui sont soit présents en faible

concentration dans la fraction soit non visualisables avec un détecteur UV ou encore à la synergie de plusieurs composés.

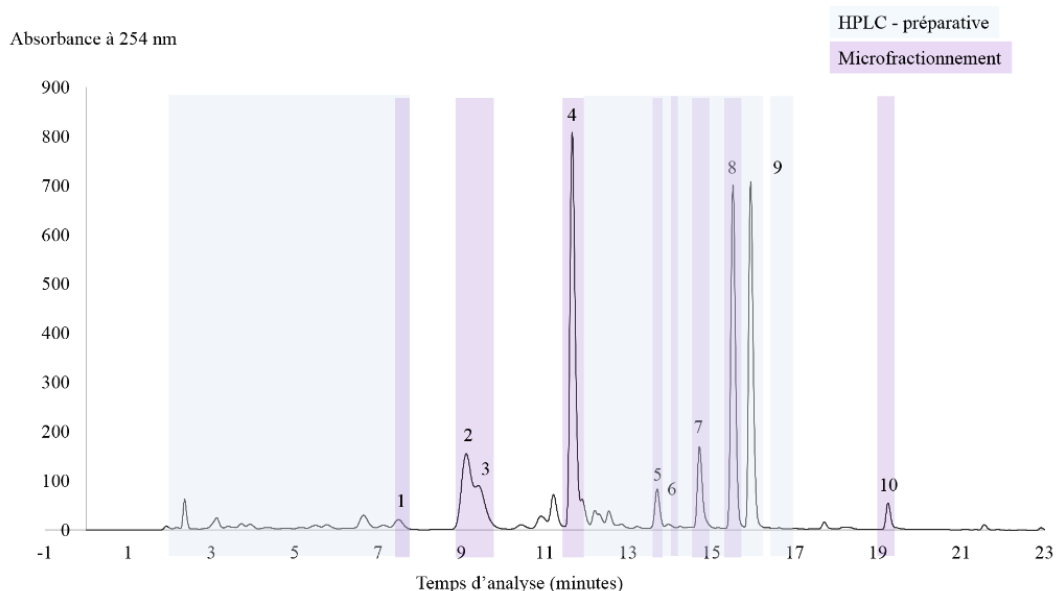
La **fraction 10** quant à elle présente un profil avec un seul pic majoritaire ne correspondant ni aux 2 naphthoquinones connues, ni aux flavonoïdes glycosylés mis en évidence par le microfractionnement. Son profil chromatographique a montré un pic majoritaire en UV à un temps de rétention de 16,5 minutes avec des maxima d'absorbance UV à 255, 273 et 330 nm, proches de ceux des 2 autres naphthoquinones (248, 278 et 330 nm). Cette fraction a été analysée par HPLC couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution. L'ion pseudo-moléculaire de ce composé en mode positif possède un rapport masse sur charge de 375,0858. Une formule brute correspondant à  $C_{22}H_{14}O$  a pu être proposée avec une erreur de 0,7 ppm par rapport à la masse théorique. Ce composé pourrait également correspondre à l'impatienol tout comme le pic de la microfraction 37 vu précédemment. Le rapport  $m/z$  et les formules brutes de ces 2 produits étant identiques, il pourrait s'agir de 2 isomères de position, l'un ayant un temps de rétention de 16,5 min (fraction 10 HPLC préparative) et l'autre un temps de rétention de 19,1 min (microfraction 37). Des analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Le fractionnement par HPLC-préparative a donc été répété plusieurs fois pour isoler le composé d'intérêt en quantité suffisante pour l'analyse par RMN. La masse de matière obtenue était cependant relativement faible. Pour 3 injections de 2 mL de 40 mg d'extrait chacune, 0,7 mg de produit ont pu être obtenus. Une fois l'ensemble de la fraction 10 séché, celle-ci a été resolubilisée dans du DMSO deutéré compatible avec l'analyse RMN. Divers solvants deutérés ont été testés au préalable mais n'ont pas permis de solubiliser correctement le composé (chloroforme, acétone, méthanol, dichlorométhane,  $D_2O$ , pyridine et acétonitrile). La faible concentration de la fraction 10 n'a pas permis l'obtention de résultats exploitables en RMN.

Les molécules présentes dans les microfractions et fractions actives de l'extrait éthanolique de feuilles d'IGR détectables en HPLC-UV et HPLC-HRMS ont été mises en évidence. Un total de 10 composés plus ou moins susceptibles d'être responsables de l'activité phytotoxique ont été identifiés (**figure III-41**). Le composé 9 est très peu visible sur le chromatogramme de l'extrait, mais la fraction 10 de l'HPLC préparative est enrichi en ce composé. L'activité de certains composés n'a pu être détectée que suite à l'HPLC préparative (composé 9 – **tableau III-12**), ou suite au microfractionnement (composés 1, 2,3,4 et 10 – **tableau III-12**), les deux méthodes sont donc complémentaires.

Ces composés ont pu être identifiées grâce à leurs données spectrales et à des molécules de référence (hypersoside, isoquercétine, kaempférol-3-O-glucoside, lawsone, 2-MNQ) et d'autres sont encore en cours d'identification comme l'impatienol ou un de ces isomères.

Néanmoins, la majorité des molécules présentes dans l'IGR ayant une activité semblent être des naphthoquinones et des flavonoïdes, ces deux classes étant déjà connues pour leurs propriétés phytotoxiques, cependant pour certaines, leur activité antigerminative n'avait pas encore été décrite dans un extrait d'IGR.



**Figure III-41 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait d'IGR par HPLC-DAD avec en bleu les zones actives détectées grâce à l'HPLC préparative et en violet celles mises en évidence grâce au microfractionnement**

**Tableau III-12 – Composés identifiés dans les fractions actives de l'extrait éthanolique d'IGR par HPLC Préparative (HP) ou grâce au microfractionnement (MF), \* identifié grâce à un standard.**

N° composé	HP	MF	Tr (min)	[M+H] <sup>+</sup>	Formule brute	Δ ppm	λ <sub>max</sub>	Proposition d'identification
1		14	7,4				236,300,340	Tautomère de lawsone?
2		7	8,78	465,1028	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	6,1	255,355	Hyperoside *
3		8	9,05	465,1612	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	5,6	255,355	Isoquercétine *
4		22	11,65	449,1050	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	6,4	260, 350	Kaempférol-3-O-glucoside *
5	4/7	27/28	13,8	175,0379	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	6,2	248,278,330	Lawsone *
6		27	14,3	289,0687	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	6,8	252,280, 330	nd (naphthoquinone)
7	7	28	14,6	351,2496	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	9,6	287, 370	nd
8	8	30	15,46	189,0546	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	1,2	247,280,335	2-MNQ *
9	10		16,5	375,0861	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	0,7	255, 273, 330	Impatiénol ou isomère
10		37	19,15	375,0863	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	6,5	252,276,330	Impatiénol ou isomère

#### 4. Conclusions

Le potentiel phytotoxique des extraits de la balsamine de l'Himalaya a pu être étudié et un lien direct avec les molécules responsables de l'activité a pu être établi pour la première fois.

La culture *in vitro* de la plante a permis d'évaluer le potentiel antigerminatif d'un extrait éthanolique de suspensions cellulaires, qui s'est avéré inactif bien que possédant des flavonoïdes. Les suspensions cellulaires produisant très peu de molécules d'intérêt sans étapes d'élicitation, il serait intéressant de tester différents éliciteurs et de voir l'impact des différentes molécules produites sur l'activité antigerminative des suspensions.

Les extraits des organes de la plante, ont montrés quant à eux une activité antigerminative intéressante notamment dans les extraits éthanoliques et à l'acétate d'éthyle de fleurs et de feuilles. Le microfractionnement couplé au test d'activité a été optimisé pour mesurer l'activité des fractions, Cette méthode a permis de mettre en évidence 10 molécules majoritaires dans les fractions actives dont certaines participent à l'activité de l'extrait éthanolique d'IGR. Ces molécules sont majoritairement des naphtoquinones et des flavonoïdes. Cette identification a été confirmée pour les naphtoquinones par une séparation et un fractionnement en utilisant une HPLC préparative. Cette deuxième séparation chromatographique à plus grande échelle a permis de mettre en évidence une molécule active supplémentaire, peu visible sur le chromatogramme UV de l'extrait et qui semble elle aussi être une naphtoquinone.

L'identification des molécules actives dans un extrait est un processus complexe, qui comme décrit dans ce chapitre a nécessité l'utilisation de plusieurs techniques de séparation chromatographique et de détection (UV et spectrométrie de masse). Néanmoins, il est possible que toutes les molécules actives n'aient pas été identifiées lors de cette approche si ces composés étaient présents en faible quantité dans l'extrait ou si leur activité était faible. De plus, il a été considéré que les pics actifs correspondaient aux pics majoritaires dans les fractions ce qui peut s'avérer erroné pour les molécules comme l'hyperoside, l'isoquercétine et la lawsone qui semblent participer faiblement à l'activité de l'extrait d'IGR.

La méthodologie de criblage comprenant le test d'activité et le microfractionnement couplé à la détection de l'activité est un bon outil pour réaliser des études préliminaires sur les extraits de plantes possédant une activité phytotoxique. Cette méthode a été mise en place à plus grande échelle pour permettre le criblage d'autres plantes ayant un potentiel allélopathique et mettre en évidence des molécules ayant une activité bioherbicide.

---

# CHAPITRE IV

---





## Chapitre IV - Recherche de composés à potentiel allélopathique dans des plantes invasives, adventices et ornementales vigoureuses

### 1. Étude bibliographique des différentes plantes d'intérêt :

La méthode en plaque 96 puits développée dans le chapitre 2 a pu être utilisée pour étudier l'activité phytotoxique des extraits des différents organes de la balsamine de l'Himalaya et identifier les molécules responsables de cette activité dans le chapitre 3. Dans le but de découvrir de nouvelles molécules ayant un potentiel phytotoxique, cette méthode a été utilisée pour déterminer l'activité de plantes invasives, adventices ou ornementales vigoureuses récoltées dans le Bas Rhin, au Sud de Strasbourg à Illkirch (**figure IV-1 (1)**) et Gerstheim (**figure IV-1 (2)**). En effet, ces plantes ayant une capacité à se développer rapidement et au détriment d'autres plantes, elles pourraient produire des composés phytotoxiques utilisables comme composés bioherbicides.



Figure IV-1 – Localisation des lieux de récolte des plantes étudiées en France, dans le Bas Rhin au Sud de Strasbourg.

La partie aérienne d'une vingtaine de plantes majoritairement des dicotylédones de familles botaniques diverses ont été récoltées (**tableau IV-1**). L'activité de 7 d'entre elles a été évaluée et les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre, l'analyse de l'activité des autres plantes récoltées est en cours de traitement. Dans un premier temps, une brève étude bibliographique des plantes sélectionnées a été réalisée pour détailler les caractéristiques botaniques, phytochimiques et les utilisations traditionnelles connues. Puis leur activité a été

évaluée en utilisant la méthode en plaque 96 puits. L'identification botanique de chaque espèce a été confirmée par Gisèle Haan-Archipoff, maître de conférences en botanique et responsable de l'herbier du jardin botanique de Strasbourg. Une planche d'herbier a été réalisée pour chaque espèce et conservée au laboratoire. De plus, comme chaque espèce a été collectée dans la nature, les déclarations pour l'accès aux ressources génétiques et le partage des avantages découlant de leur utilisation ont été effectuées auprès du ministère de l'environnement afin d'être conforme à la réglementation en vigueur.

**Tableau IV-1 – Liste des plantes récoltées et du lieu de la collecte**

Nom scientifique	Nom commun	Lieu de récolte
<i>Impatiens glandulifera</i> L.	Balsamine de l'Himalaya	Gerstheim
<i>Oxalis corniculata</i> L.	Oxalide corniculée	Gerstheim
<i>Escholtzia californica</i> Cham.	Pavot de Californie	Gerstheim
<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Th.Wolf	Fraisier des Indes	Gerstheim
<i>Clematis vitalba</i> L.	Herbe aux gueux	Gerstheim
<i>Borago officinalis</i> L.	Bourrache	Gerstheim
<i>Glechoma hederacea</i> L.	Lierre terrestre	Gerstheim
<i>Galium aparine</i> L.	Gaillet gratteron	Gerstheim
<i>Galium mollugo</i> L.	Gaillet commun	Gerstheim
<i>Hedera helix</i> L.	Lierre grimpant	Gerstheim
<i>Geranium robertianum</i> L.	Herbe à Robert	Gerstheim
<i>Potentilla reptans</i> L.	Potentille quintefeuille	Gerstheim
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Pomme de terre	Gerstheim
<i>Pilosella aurantiaca</i> (L.) F.W.Schultz & Sch.Bip.	Epervière orangée	Gerstheim
<i>Portulaca oleraceae</i> L.	Pourpier commun	Gerstheim
<i>Thuja occidentalis</i> L.	Thuya	Gerstheim
<i>Geum urbanum</i> L.	Benoîte commune	Gerstheim
<i>Chenopodium album</i> L.	Chénopode blanc	Illkirch
<i>Gaillardia spp</i> Foug.	Gaillarde	Illkirch
<i>Heliantus tuberosus</i> L.	Topinambour	Gerstheim
<i>Allium ursinum</i> L.	Ail des ours	Illkirch
<i>Rhus Typhina</i> L.	Sumac de Virginie	Illkirch

### **1.1 Le fraisier des Indes :**

La première plante étudiée est le fraisier des Indes également appelé *Duchesnea indica* (Andrews) Foke ou encore *Potentilla indica* (Andrews) Th.Wolf. C'est une plante vert sombre de la famille des Rosaceae qui pousse en colonies. Les feuilles sont bordées de grosses dents irrégulières et les fleurs sont jaunes et donnent un fruit rouge qui ressemble à une fraise (**figure IV-2**) mais qui est insipide (Tela botanica). Cette plante est considérée comme invasive en

Europe et notamment en Allemagne, en Suisse et en Autriche où son développement s'est accéléré ces vingt dernières années (Littschwager *et al.*, 2010).



**Figure IV-2 – Plant de fraisier des Indes**

La phytochimie de la plante a été décrite notamment par une étude de Zhu *et al.* (2015) qui a mis en évidence la présence de composés phénoliques avec en majorité des tannins hydrolysables, des acides ellagique, caféique, mais également des flavonoïdes avec la présence de quercétine et de kaempférol glycosylés dans des extraits hydroalcooliques de plante entière.

En ethnobotanique, la plante est connue pour avoir des effets sur la toux, la diarrhée, mais également sur la pharyngite (Khuda *et al.*, 2012).

Les propriétés allélopathiques de cette plante ont été étudiées grâce à la méthode sandwich, mais l'influence de 10 mg de poudre de plante n'a pas permis de visualiser une inhibition de la croissance racinaire ou de l'hypocotyle de graines de *Lactuca sativa* L. (laitue) (Ali *et al.*, 2019). Dans l'étude de Khuda *et al.* (2012), la fraction à l'acétate d'éthyle d'un extrait méthanolique de feuilles a montré une inhibition de la germination de *Lemna minor* L. (petite lentille d'eau, flottant sur l'eau) dès l'incorporation de 5 µg de fraction dans le milieu de culture. En revanche, l'extrait brut méthanolique a montré une plus faible inhibition de la germination (10% à 5 µg jusqu'à 25 % à 500 µg).

L'activité antigerminative de cette plante semble donc être dépendante de la méthode et du type de graines cibles utilisées.

## **1.2 La benoîte commune :**

La deuxième plante étudiée est la benoîte commune dont le nom scientifique est *Geum urbanum* L. et qui est une plante de la famille des Rosaceae. Elle mesure entre 20 et 60 cm et est velue. Ses fibres ont une odeur de clou de girofle, ses feuilles sont dentées et elle possède de petites fleurs jaunes à 5 pétales (**figure IV-3**) (Tela botanica). Elle a parfois été décrite comme une plante adventice des jardins (Taylor, 1997)



Figure IV-3 – Plant de benoite commune (Laurent Petit, Tela Botanica)

Du point de vue phytochimique, l'huile essentielle de racines de benoite contient des phénylpropanoïdes (comme l'eugénol), des monoterpènes et des sesquiterpènes. La plante contient des tannins, des caroténoïdes, mais également de l'acide caféique, de l'acide chlorogénique ainsi que du vicianose qui est un diholoside composé de L-arabinose et de D-glucose (Al-Snafi, 2019).

La benoite est utilisée traditionnellement comme sédatif, hémostatique et anti-inflammatoire. L'extrait méthanol/eau (70/30, v/v) de feuilles et de racines de benoite a montré une activité antioxydante comparable à celle du trolox (Owczarek *et al.*, 2015). L'extrait éthanolique de benoite a également montré des résultats intéressants pour la prévention de la maladie de Parkinson, en diminuant l'agrégation de protéines caractéristiques de cette maladie (Lobbens *et al.*, 2016).

La benoite est une plante dont le potentiel allélopathique a été peu testé mais qui est utilisée pour évaluer l'impact de plantes invasives sur les plantes environnantes. Elle se développe par exemple bien dans les sols naturels en compétition avec un hybride de renouée du Japon (*Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr.) (Parepa et Bossdorf, 2016) mais également dans le substrat dans lequel s'était développée *Alliaria petiolata* L. (alliaire officinale) (Prati et Bossdorf, 2004). Sa croissance a également été testée en présence de balsamine de l'Himalaya, la benoite est l'une des plantes dont les racines sont les moins affectées par la présence de cette plante. En revanche, mise au contact de poudre de feuilles d'IGR, la taille des racines de benoite est réduite (Bieberich *et al.*, 2018).

### **1.3 Le pourpier commun :**

Le pourpier commun ou pourpier maraicher, *Portulaca oleraceae* L., est une plante annuelle de 10 à 30 cm de la famille des Portulacaceae. Ses feuilles sont opposées et épaisses et ses fleurs sont de petites tailles et jaunes (**figure IV-4**). Cette plante, consommée en salade, peut provoquer une baisse de rendement des cultures de céréales. Elle est donc à la fois une plante adventice et alimentaire.



Figure IV-4 – Plant de pourpier commun (Jean-Claude Echardour, Tela botanica)

La phytochimie du pourpier montre qu'il contient des flavonoïdes comme le kaempférol, la lutéoline ou les portulacanones spécifiques du genre, des alcaloïdes comme l'oleracine et la dopamine, des terpènes (portulosaïde, lupéol) et des acides gras comme l'acide palmitique, stéarique ou oléique (Y. X. Zhou *et al.*, 2015).

Cette plante est utilisée traditionnellement comme fébrifuge, antiseptique ou vermifuge (Y. X. Zhou *et al.*, 2015). Différents extraits de cette plante ont montré des activités différentes, en effet un extrait méthanol/eau (70/30, v/v) a présenté une activité antibactérienne, un extrait aqueux a montré une réduction de l'inflammation et la poudre de graine peut permettre de réduire le poids corporel ainsi que l'hyper-insulinémie et pourrait être utilisée dans le traitement du diabète (Y. X. Zhou *et al.*, 2015).

L'étude du potentiel allélopathique de cette plante montre que des extraits aqueux de feuilles et de racines inhibent la germination des graines de *Cucurbita pepo* L. lorsque leur concentration augmente (Abd-Elgawad *et al.*, 2015). Les extraits méthanoliques de plante entière à une concentration de 10 mg/mL inhibent de 40 % la germination de *Trifolium repens* L. (trèfle blanc) et de 10% la germination de *Raphinus sativus* L. (radis cultivé) (Alarcon *et al.*, 2014).

L'impact de la culture des graines de pourpier sur les graines alentours a également été étudié. La germination des graines de *Phaseolus vulgaris* L. (haricot vert) est inhibée de 10%, la taille des radicules est diminuée de quatre fois lorsqu'elles sont au contact des graines de pourpier. Mais la réciproque est également vraie, la croissance des graines de pourpier est inhibée de 10 % par la présence de *P. vulgaris* (Rashidi *et al.*, 2021).

#### **1.4 La potentille quintefeuille :**

La potentille également appelé *Potentilla reptans* L. ou *Fragaria pentaphylla* Crantz, fait partie de la famille de Rosaceae avec 500 espèces faisant partie du genre *Potentilla*. La potentille (**figure IV-5**) est une petite plante vivace dont les feuilles sont pétiolées et digitées (5 doigts) c'est pour cela qu'elle est souvent appelée quintefeuille. Les fleurs sont jaunes et mesurent 1,5 à 3 cm de diamètre.



Figure IV-5 – Plant de potentille (Mathieu Sinet Tela Botanica)

Dans une étude phytochimique de cette plante, Ahangar *et al.* (2021) ont montré que l'extrait méthanol/eau (80/20 v/v) contenait des flavonoïdes, des tannins, des triterpènes, des acides phénoliques et des saponines (Ahangar *et al.*, 2021). Une autre espèce du genre *Potentilla* contient quant à elle de l'umbélliférone, et des flavones (acacétine et chryisine) (Ahangar *et al.*, 2021).

Les plantes du genre *Potentilla* ont beaucoup d'utilisations traditionnelles à travers le monde. En Europe, elles sont utilisées pour réduire l'inflammation et la diarrhée et la potentille quintefeuille est utilisée pour réduire les ulcères buccaux. L'activité de différents extraits de cette plante a été évaluée. Un extrait méthanol/eau de *Potentilla reptans* a montré des effets [antinociceptifs](#) et anti-inflammatoires (Ahangar *et al.*, 2021). Des extraits aqueux de rhizomes et de parties aériennes ont montré une activité antibactérienne.

La seule étude sur le potentiel allélopathique de cette plante est celle de Luminita *et al.* (2018) qui ont étudié l'influence d'extrait aqueux de feuilles de potentille sur le développement de *Agropyron repens* L. ou chiendent qui est une Poaceae, adventice des cultures. L'utilisation d'extrait aqueux de potentille à différentes concentrations (entre 5 et 20 g/L) pour arroser les plants de chiendent a provoqué une baisse de la teneur en chlorophylle ce qui induit une diminution de la photosynthèse et en eau à cause d'une augmentation de la respiration et de la transpiration. Ces processus physiologiques sont souvent utilisés pour mesurer l'activité allélopathique des extraits lors d'études en champs ou en conditions contrôlées.

### **1.5 Le gaillet commun et gaillet gratteron :**

Deux espèces de gaillets ont ensuite été étudiées, le gaillet commun appelé également caille -lait blanc et *Gallium mollugo* L. et le gaillet gratteron également appelé *Gallium aparine* L. (**figure IV-6**). Ces deux gaillets font partie de la famille de Rubiaceae, et présentent des caractéristiques morphologiques communes comme une tige carrée, des feuilles [verticillées](#) par 6 ou 8 et des petites fleurs blanches. Néanmoins des différences sont visibles, notamment au niveau de l'aspect de la tige et des feuilles, en effet le gaillet gratteron présente des [trichomes](#) le long de la tige et des feuilles qui lui donne son nom contrairement au gaillet commun qui a une tige et des feuilles glabres.



**Figure IV-6 – Plant de gaillet commun (à gauche), (Julien Barataud, Tela botanica) et de gaillet gratteron (à droite), (Paul Fabre, Tela botanica)**

Les deux espèces de gaillets contiennent des polyphénols (acide chlorogénique et caféique par exemple), des phytostérols comme le campestérol ou le  $\beta$ -sitostérol (Mocan *et al.*, 2016). La composition phytochimique est plus détaillée pour le gaillet gratteron, avec la présence d'acides gras (acide palmitique, acide stéarique, acide linoléique, oléique) (Atmaca *et al.*, 2016).

Les gaillets sont traditionnellement utilisés pour la coagulation du lait, mais également en tant que diurétiques et anti-diarrhéiques (Mocan *et al.*, 2016). Concernant les activités biologiques des deux espèces, celles du gaillet gratteron sont mieux décrites dans la littérature, avec une activité cytotoxique des extraits méthanoliques sur des cellules du cancer du sein (Atmaca *et al.*, 2016) et une activité antibactérienne des extraits au chloroforme (Tatyana Vasilevna *et al.*, 2016). De plus, les trichomes de ce gaillet sont étudiés pour déterminer leurs propriétés physiques dans le but de les reproduire *in vitro* (Andrews et Badyal, 2014). Le gaillet commun est quant à lui anti-oxydant et présente également une activité antibactérienne (Tomovic *et al.*, 2021)

Les propriétés allélopathiques du gaillet gratteron ont été évaluées sur des céréales. Un extrait aqueux de gaillet gratteron a un effet stimulant sur la germination de différentes variétés de graines de maïs à faible concentration (deux fois plus de graines ont germé après 72 h de culture par rapport au contrôle), mais à plus forte concentration il a peu d'effet ou un léger effet inhibiteur par rapport au taux de germination du contrôle. Ce même extrait a un effet stimulateur par rapport à la masse fraîche des plantules de maïs peu importe la variété testée à plus faible concentration (Pula *et al.*, 2016). Dans l'étude de Kwiecińska-Poppe *et al.* (2011), un extrait aqueux diminue la capacité des graines de seigle et de triticale (un hybride de blé et de seigle) à germer lorsque la concentration en extrait augmente.

Les propriétés du gaillet commun étant peu étudiées, il est intéressant de pouvoir comparer son activité avec celle du gaillet gratteron.

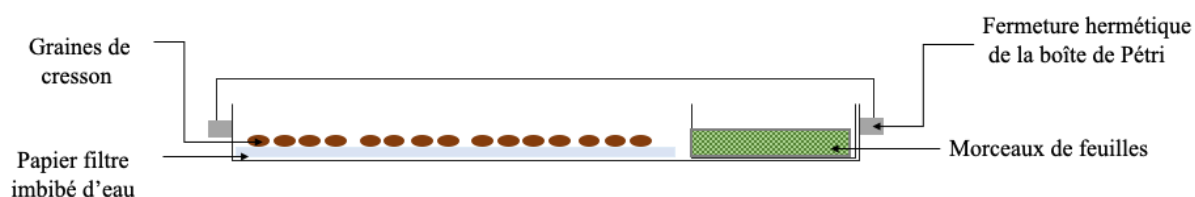


### 1.6 Le thuya :

Le thuya appelé également *Thuja occidentalis* L. fait partie des [gymnospermes](#) (plantes à graines nues en opposition aux Angiospermes) et est de la famille des Cupressaceae. C'est un arbre issu d'Amérique du Nord introduit en Europe pour être ornemental, qui peut mesurer de 15 à 20 mètres de haut et qui possède des feuilles à écailles (Belal Nasser, 2005). Dans le genre *Thuja*, quatre espèces sont décrites et plusieurs variétés de *Thuja occidentalis* sont connues (Caruntu *et al.*, 2020).

Cette plante contient des coumarines (umbelliférone, acide p-coumarique), des flavonoïdes comme le kaempférol, la catéchine ou la quercétine, des acides tanniques et des polysaccharides. De l'huile essentielle peut être extraite de cette plante, elle contient principalement des terpènes comme le bornéol, le limonène ou encore la thujone. Cette dernière peut être toxique à haute dose mais a également une activité antibactérienne contre les bactéries gram négatif. Les polysaccharides contenus dans cette plante ont également montrés une activité anti-inflammatoire *in vivo* et anti-virale *in vitro*.

L'activité allélopathique de la plante a été étudiée. L'impact des composés volatils contenus dans les feuilles de thuya (*Thuja occidentalis*) sur la germination des graines de cresson a été évaluée grâce à la mise en contact de feuilles de thuya et de graines de cresson selon la **figure IV-7**. Les morceaux de feuilles ont été déposés dans une petite boîte de Petri, posée dans une plus grande contenant un papier filtre imbibé d'eau et sur lequel ont été posées des graines de cresson. La boîte étant fermée hermétiquement grâce à l'utilisation de parafilm, seul l'impact des composés volatils a été évalué sur la germination des graines de cresson. Plus la quantité de feuilles était importante plus la germination était inhibée. Des analyses ont été menées sur les composés purs responsables de l'activité en utilisant la méthode en papier filtre, et les composés ayant la plus faible IC<sub>50</sub> étaient le bornéol, l'isobornéol, le carvacol et le thymol. L'acide abscissique a également eu une activité inhibitrice de la germination des graines de cresson (Oster *et al.*, 1990).



**Figure IV-7 – Schéma de la méthode utilisée par Oster *et al.* (1990) pour déterminer l'influence des molécules volatiles contenues dans les morceaux de feuilles de thuya sur la germination des graines de cresson.**

Les études portant sur le potentiel allélopathique du thuya se sont surtout intéressées aux huiles essentielles pouvant être produites par ce genre. Très peu d'études ont analysé l'impact de différents extraits sur la germination des graines. Une étude publiée dans un journal canadien

(Keeling *et al.*, 2018) a montré l'impact des extraits méthanoliques de différents conifères dont deux espèces de thuya (*Thuja plicata* et *Thuja occidentalis*) sur la germination de graines d'*Arabidopsis thaliana* L. (arabette des dames) et les deux espèces de thuya ont montré l'EC<sub>50</sub> la plus faible. Cet impact, comme précédemment pour les huiles essentielles, peut être attribué à la présence de composés terpéniques présents dans les résines de Thuya, mais également à la présence d'acide abscissique. En effet, sur un mutant d'*Arabidopsis thaliana* L. insensible à l'acide abscissique, l'inhibition de la germination est plus faible (Keeling *et al.*, 2018).

Les propriétés allélopathiques des différentes plantes que nous avons sélectionnées ont été peu étudiées et si certaines comme le pourpier ou le fraisier ont montré une activité, les molécules responsables de cette activité n'ont pas été identifiées. De plus, les études se sont concentrées sur l'activité de quelques extraits, d'huiles essentielles ou sur l'impact sur la croissance lors d'interactions entre plantules. Grâce à la méthode développée, le potentiel phytotoxique de ces plantes a été évalué sur une graine cible, le cresson, de manière standardisée en utilisant des extraits de polarités variées. De plus, les molécules responsables de cette activité pourront être identifiées grâce au couplage entre la séparation chromatographique et le test d'activité bioherbicide.

## 2. Évaluation de l'activité des différentes plantes :

### 2.1 Extraction des parties aériennes des plantes récoltées :

Après récolte, les plantes ont été placées à -80°C pour prévenir toute dégradation du matériel végétal, elles ont été cryobroyées grossièrement, lyophilisées et broyées au moulin à café pour obtenir une poudre fine qui a servi de matrice pour l'extraction. Les 5 solvants utilisés sont les mêmes que pour les extraits d'IGR à l'exception de l'isopropanol qui avait donné des résultats similaires à l'éthanol en termes de rendement d'extraction et d'activité biologique pour les extraits d'IGR.

Le même protocole que pour les extraits d'IGR (Matériel et Méthodes) a été appliqué et les rendements d'extraction ((masse finale d'extrait sec obtenue / masse de poudre sèche prélevée au départ) x 100) ont également été calculés pour chaque plante (**tableau IV-2**). Globalement, plus le solvant est polaire, plus les rendements d'extraction sont élevés. Les rendements maximaux sont obtenus en utilisant de l'eau.

**Tableau IV-2 – Rendements d'extraction (% m/m) en fonction des solvants utilisés et de la plante extraite.**  
\* seuls 2 cycles d'extraction ont été effectués

Plantes testées	Solvants d'extraction				
	Heptane	Acétate d'éthyle	Éthanol	Éthanol/eau (60/40 ; v/v)	Eau
Fraisier des Indes	1,64	13,43	5,50	31,20	31,17
Benoite commune*	2,56	3,72	5,42	31,09	31,58
Pourpier commun	0,32	3,33	4,99	23,77	29,38
Potentille quintefeuille	1,27	2,64	7,50	28,99	25,43
Gaillet gratteron	4,30	6,02	13,84	37,26	43,18
Gaillet commun	5,09	4,45	11,27	31,92	37,40
Thuya sp.	5,21	6,29	6,11	17,00	17,54

## **2.2 Activité des différents extraits :**

### **2.2.1 Impact sur la germination :**

Comme pour les extraits d'organe d'IGR, l'activité des extraits des différentes plantes a été évaluée en utilisant le cresson comme plante modèle. Les extraits ont été testés à 2 concentrations : 20 mg/mL et 5 mg/mL ce qui correspond respectivement à une concentration dans chaque puits de 6,67 mg/mL et 1,67 mg/mL. Pour mesurer l'activité de chaque plante des contrôles négatifs ont été réalisés, avec les solvants de resolubilisation des extraits qui sont les mélanges isopropanol/eau (50/50 ; v/v), éthanol/eau (60/40 v/v) et un témoin de germination sans solvant. Le témoin positif de ces tests est la lawsone utilisée à une concentration de 0,25 mg/mL.

Les résultats des **extraits à 20 mg/mL** sont présentés dans le **tableau IV-3**. Les contrôles négatifs avec de l'isopropanol/eau (50/50, v/v) et sans solvant permettent à plus de 80 % des graines de germer. La lawsone à 0,25 mg/mL permet à seulement 10% des graines de cresson de germer ou 30 % des graines dans le cas du test des extraits de fraisier.

La majorité des extraits à l'acétate d'éthyle des plantes testées ont montré une activité antigerminative avec des taux de germination significativement plus faibles que ceux des témoins négatifs. Pour les extraits à l'acétate d'éthyle de potentille quintefeuille et de fraisier des Indes, le taux de germination est intermédiaire entre celui obtenu avec les contrôles positifs et celui obtenu avec les négatifs, alors que pour la benoite commune, le pourpier commun et le thuya le taux de germination est similaire à celui obtenu pour la lawsone. Tous les extraits de thuya testés à 20 mg/mL ont montré un impact sur la germination des graines de cresson identiques à celui de la lawsone.

A cette concentration, tous les extraits à l'acétate d'éthyle et tous les extraits de thuya sont actifs, pour distinguer les extraits les plus actifs, les résultats obtenus avec une concentration en extraits de 5 mg/mL ont été comparés (**tableau IV-4**).

**Tableau IV-3 – Taux de germination moyens (erreur type de la moyenne) des graines de cresson mesurés pour les extraits des 7 plantes obtenus par les différents solvants d'extraction, testés à 20 mg/mL. 12 graines par plaque 96 puits, 3 plaques par condition (en vert foncé les extraits ayant une activité comparable à celle de la lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test et en vert clair les extraits ayant une activité intermédiaire, en blanc les extraits ayant une activité différente de celle de la lawsone). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination pour une plante donnée selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ .**

	Fraisier des Indes	Benoite commune	Pourpier commun	Potentille quintefeuille	Gaillet commun	Gaillet gratteron	Thuya sp.
Heptane	75,0 (8,3) <sup>a</sup>	91,7 (0,0) <sup>a</sup>	66,7 (8,3) <sup>a</sup>	80,6 (2,8) <sup>ab</sup>	22,2(12,1) <sup>cd</sup>	13,9 (7,3) <sup>b</sup>	11,1 (2,8) <sup>b</sup>
AcOEt	58,3 (0,0) <sup>ab</sup>	33,3 (8,3) <sup>b</sup>	13,9 (2,8) <sup>b</sup>	16,7 (8,3) <sup>de</sup>	8,3 (4,8) <sup>d</sup>	2,7 (2,8) <sup>b</sup>	2,8 (2,8) <sup>b</sup>
EtOH	55,6(12,1) <sup>ab</sup>	75,0 (0,0) <sup>a</sup>	61,1 (7,3) <sup>a</sup>	41,7(17,3) <sup>ce</sup>	66,7 (4,8) <sup>ab</sup>	11,1(2,8) <sup>b</sup>	5,6 (5,5) <sup>b</sup>
EtOH/H <sub>2</sub> O	75,0 (12,7) <sup>a</sup>	86,1 (2,8) <sup>a</sup>	75,0 (4,8) <sup>a</sup>	52,8 (2,8) <sup>bc</sup>	55,6 (2,8) <sup>bc</sup>	83,3 (9,6) <sup>a</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O	66,7 (16,7) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	88,9 (2,8) <sup>a</sup>	47,2 (2,8) <sup>bcd</sup>	88,9 (2,8) <sup>ab</sup>	30,5 (5,5) <sup>b</sup>	0,0 (0,0) <sup>b</sup>
Lawsone	27,8 (2,8) <sup>b</sup>	11,1 (7,3) <sup>b</sup>	5,6 (2,8) <sup>b</sup>	8,3 (4,8) <sup>e</sup>	11,1 (5,5) <sup>d</sup>	11,1 (5,5) <sup>b</sup>	8,3 (4,8) <sup>b</sup>
Isopropanol 50% (T)	75,0 (9,6) <sup>a</sup>	94,4 (2,8) <sup>a</sup>	86,1 (5,5) <sup>a</sup>	94,4 (5,5) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	77,8(2,8) <sup>a</sup>
Témoin -	91,7 (0,0) <sup>a</sup>	83,3 (0,0) <sup>a</sup>	94,4 (2,8) <sup>a</sup>	94,4 (5,5) <sup>a</sup>	83,3 (9,6) <sup>a</sup>	83,3 (9,6) <sup>a</sup>	80,6 (7,3) <sup>a</sup>

Lors de l'évaluation de l'activité antigermative **des extraits à 5 mg/mL** (tableau IV-4.), les contrôles négatifs, à savoir l'éthanol et le témoin de germination, ont permis d'obtenir des taux de germination des graines de cresson supérieurs à 80 %. Le contrôle positif utilisant la lawsone à 0,25 mg/mL a permis d'obtenir des taux de germination globalement inférieurs à 20 %.

Les taux de germination des graines de cresson en contact avec les différents extraits de plantes ont été comparés à ceux obtenus en utilisant la lawsone. Sur les 35 extraits testés seuls quatre ont montré une inhibition du taux de germination des graines de cresson similaires à celui obtenu avec la lawsone : l'extrait à l'acétate d'éthyle de potentille quintefeuille, de gaillet gratteron et de gaillet commun et l'extrait éthanolique de thuya. L'activité de l'extrait éthanolique de thuya pourrait être expliquée par la présence de thujone, qui est extraite lorsque la proportion d'éthanol augmente (Belal Nasser, 2005). L'activité de l'extrait à l'acétate d'éthyle de potentille et de gaillets pourrait être due à des molécules de polarité intermédiaire.

Tous les autres extraits n'ont pas inhibé de façon significative la germination avec des taux de germination proches de celui du contrôle négatif ou alors des taux moyens comme dans le cas de l'extrait à l'acétate d'éthyle du pourpier qui intermédiaire entre celui du témoin négatif et celui du témoin positif

Les extraits les plus actifs sont donc ceux à l'acétate d'éthyle de potentille, gaillet commun et gratteron et l'extrait éthanolique de thuya.

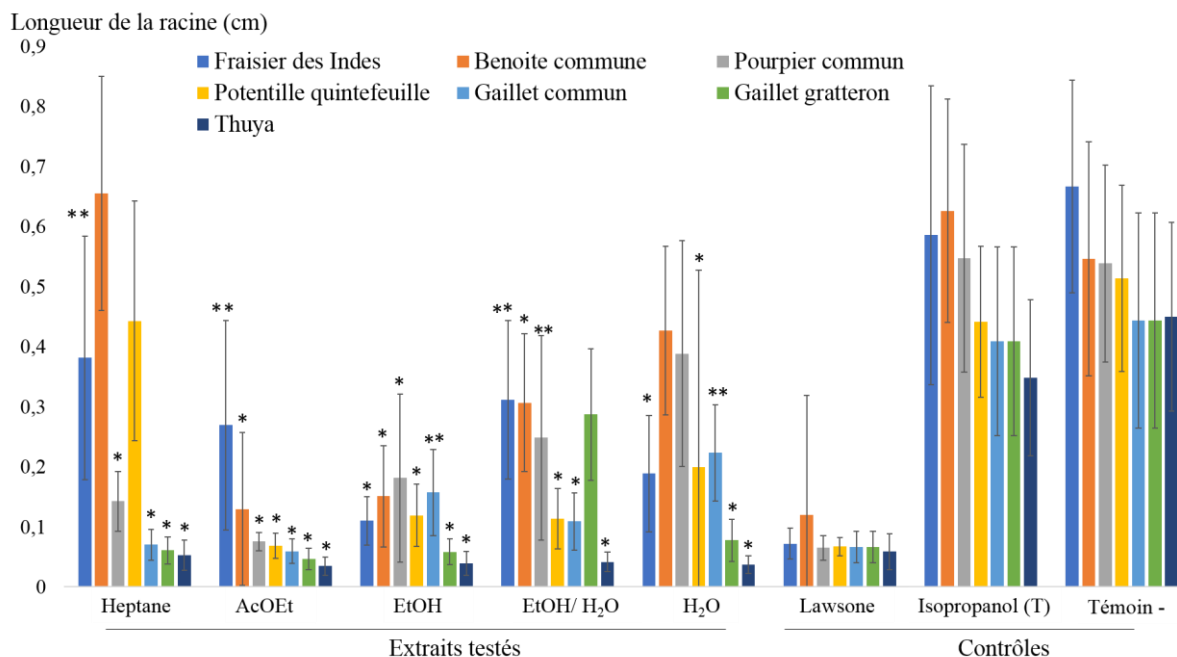
**Tableau IV-4 – Taux de germination moyens (erreur type de la moyenne) des graines de cresson mesurés pour les extraits des 7 plantes obtenus par les différents solvants d'extraction, testés à 5 mg/mL. 12 graines par plaque 96 puits, 3 plaques par condition (en vert les extraits ayant une activité comparable à celle de la**

**lawsone à 0,25 mg/mL pour ce test, en blanc les extraits ayant une activité différente de celle de la lawsone). Les lettres indiquent une différence significative entre les taux de germination pour une plante donnée selon un test de Tukey au seuil  $\alpha = 0,05$ .**

	Fraisier des Indes	Benoite commune	Pourpier commun	Potentille quintefeuille	Gaillet commun	Gaillet gratteron	Thuya sp.
Heptane	86,1(2,8) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	69,4 (10,0) <sup>ab</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	58,3 (9,6) <sup>ab</sup>	63,8 (7,3) <sup>ab</sup>	75,0 (4,8) <sup>ab</sup>
AcOEt	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	69,4 (2,8) <sup>a</sup>	57,3 (12,4) <sup>b</sup>	38,9 (13,9) <sup>b</sup>	25,0 (8,3) <sup>bc</sup>	16,6 (0,0) <sup>c</sup>	86,1 (7,3) <sup>a</sup>
EtOH	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	88,9 (2,8) <sup>a</sup>	88,9 (7,3) <sup>ab</sup>	86,1 (2,8) <sup>a</sup>	69,4 (14,7) <sup>a</sup>	55,6 (7,3) <sup>b</sup>	44,4 (7,3) <sup>bc</sup>
EtOH /H <sub>2</sub> O	83,3 (4,8) <sup>a</sup>	86,1 (2,8) <sup>a</sup>	80,6 (7,3) <sup>ab</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	80,5 (5,5) <sup>a</sup>	83,3 (4,8) <sup>ab</sup>	94,4 (5,5) <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O	88,9 (2,8) <sup>a</sup>	91,7 (8,3) <sup>a</sup>	86,1 (7,3) <sup>ab</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	72,2 (10,0) <sup>a</sup>	69,4 (2,8) <sup>ab</sup>	83,3 (4,8) <sup>a</sup>
Lawsone	27,8 (7,3) <sup>b</sup>	5,6 (2,8) <sup>b</sup>	16,7 (4,8) <sup>c</sup>	16,7 (4,8) <sup>b</sup>	11,1 (2,8) <sup>bc</sup>	11,1 (2,8) <sup>c</sup>	16,7 (4,8) <sup>c</sup>
EtOH(T)	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	94,4 (2,8) <sup>a</sup>	88,9 (2,8) <sup>ab</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	94,4 (5,5) <sup>a</sup>
Témoin-	97,2 (2,8) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	91,7 (0,0) <sup>a</sup>	83,3 (4,8) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>	91,7 (4,8) <sup>a</sup>

### 2.2.2 Impact sur l'élongation racinaire :

L'impact des extraits sur l'élongation racinaire a été également évalué. Les résultats des extraits à une concentration de 20 mg/mL sont présentés dans la **figure IV-8**. Pour les contrôles négatifs, la taille de la racine est comprise entre 0,5 et 0,7 cm et pour le contrôle positif utilisant la lawsone, la taille moyenne des racines est autour de 0,1 cm. Globalement pour les différents extraits testés, ceux à l'heptane et à l'eau sont les moins actifs sur l'élongation racinaire, tout comme pour l'activité antigerminative. Les extraits éthanoliques et à l'acétate d'éthyle semblent être les plus inhibiteurs de la croissance racinaire mais aussi de la germination, les deux observations étant liées car une graine est considérée comme germée lorsque la taille de la racine est supérieure à 0,1 cm.



**Figure IV-8 - Longueur de la racine des graines de cresson en présence d'extraits des différentes plantes testées à 20 mg/mL, de lawsons et de solvants de resolubilisation (i-PrOH/H<sub>2</sub>O : 50/50 (v/v)). Témoin - : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de la longueur des racines des graines de 3 plaques (12 graines par condition) ± erreur type de la moyenne. \* valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et identiques à celles de la lawsons selon un test de Tukey  $\alpha = 0,05$ , \*\*. Valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et de la lawsons selon un test de Tukey  $\alpha = 0,05$ .**

Pour les tests d'activité en utilisant les extraits à 5 mg/mL, la longueur moyenne des racines des graines de cresson pour les contrôles négatifs est comprise entre 0,4 et 0,8 cm (**figure IV-9**). Les contrôles positifs avec la lawsons, comme précédemment inhibent la croissance racinaire avec une moyenne autour de 0,1 cm.

Les extraits de fraisier des Indes et de benoite commune inhibent pas de façon significative la croissance des racines de cresson quel que soit le solvant utilisé pour l'extraction. En effet, la longueur de la racine des graines de cresson est soit équivalente à celle observée pour le contrôle, soit légèrement inférieure sans atteindre la longueur des graines en contact avec la lawsons. Pour la potentille quintefeuille et le thuya seul un extrait inhibe la croissance des racines de façon comparable à la lawsons. Il s'agit de l'extrait à l'acétate d'éthyle pour la potentille et de l'extrait éthanolique pour le thuya. Enfin, certaines plantes présentent une activité pour plusieurs solvants d'extraction comme le pourpier et les gaillets. L'extrait à l'heptane de pourpier a une activité intermédiaire et l'extrait à l'acétate d'éthyle a une activité comparable à celle de la lawsons. Pour les gaillets, 4 et 3 extraits sur 5 présentent une activité, les extraits de gaillet commun présentent tous une activité équivalente à la lawsons

sauf l'extrait hydroalcoolique et les extraits actifs de gaillet gratteron sont les extraits à l'acétate d'éthyle, à l'éthanol et aqueux.

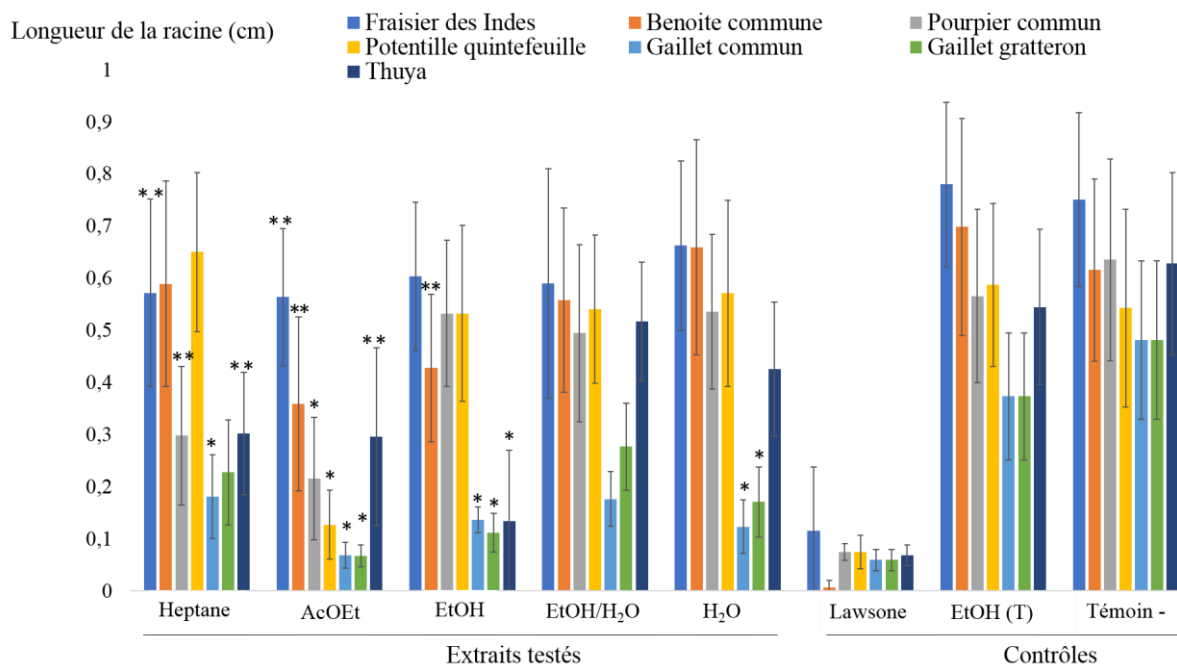


Figure IV-9 – Longueur de la racine des graines de cresson en présence d'extraits des différentes plantes testés à 5 mg/mL, de lawsone et de solvants de resubilisation (EtOH (T)). Témoin- : contrôle de germination. Les résultats sont exprimés comme la moyenne des longueurs des racines des graines de 3 plaques (12 graines par conditions)  $\pm$  erreur type de la moyenne \* valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et identiques à celles de la lawsone selon un test de Tukey  $\alpha = 0,05$ , \*\*. Valeurs significativement différentes du contrôle EtOH(T) et de la lawsone selon un test de Tukey  $\alpha = 0,05$

Les extraits éthanoliques de thuya, à l'acétate d'éthyle de potentille quintefeuille et ceux des gaillets sont les plus intéressants du point de vue de l'inhibition de la germination et de l'inhibition de la croissance racinaire des graines de cresson, ils ont donc été étudiés plus en détail dans la suite du projet.

### 3. Études phytochimiques préliminaires des extraits actifs :

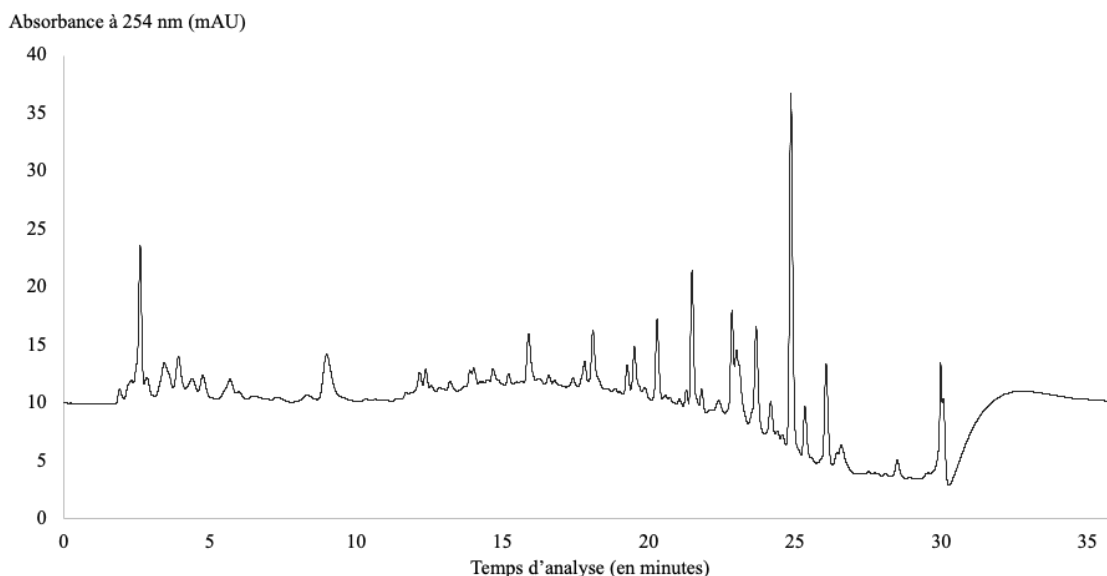
Les extraits les plus actifs de potentille et de thuya ont été analysés par HPLC couplée à une détection UV, puis l'extrait de thuya a été fractionné dans le but de déterminer les molécules actives.

#### 3.1 Extrait à l'acétate d'éthyle de potentille :

L'extrait à l'acétate d'éthyle étant l'un des plus actif, il a été analysé par HPLC couplée à une détection UV-Visible. Le gradient et la colonne utilisés pour l'analyse étaient les mêmes que pour l'analyse des extraits d'IGR. De nombreux composés étaient présents dans cet extrait

(**figure IV-10**) avec une absorbance inférieure à 40 mAU à 254 nm. Les pics visibles dans cet extrait ont des temps de rétention compris entre 2 et 27 minutes (le pic à 30 minutes n'étant pas dû à l'injection de l'extrait) avec un pic plus intense à un temps de rétention de 24,9 minutes.

Cet extrait présentait un profil phytochimique riche avec des composés ayant des temps de rétention couvrant l'ensemble du chromatogramme ce qui est peu informatif quant à la nature de la/les molécules actives. Le fractionnement bioguidé à l'aide du couplage développé sera à effectuer afin de recentrer les recherches vers la/les zones actives du chromatogramme



**Figure IV-10 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait à l'acétate d'éthyle de potentille par HPLC-DAD (gradient 1).**

### **3.2 Extraits de thuya :**

L'extrait éthanolique de thuya testé à 5 mg/mL a montré une inhibition de 55 % de la germination des graines de cresson, celui-ci a été également analysé par HPLC couplée à une détection UV-Visible. L'extrait hydroalcoolique, moins actif, a été également analysé et les profils phytochimiques ont été comparés (**figure IV-11**). Les deux extraits ont permis d'obtenir des profils très similaires à 254 nm avec globalement des pics présentant les mêmes temps de rétention et ne variant que par leur intensité. A partir de 14 minutes, les pics sont plus intenses dans l'extrait éthanolique ce qui pourrait expliquer son activité supérieure à celle de l'extrait hydroalcoolique.



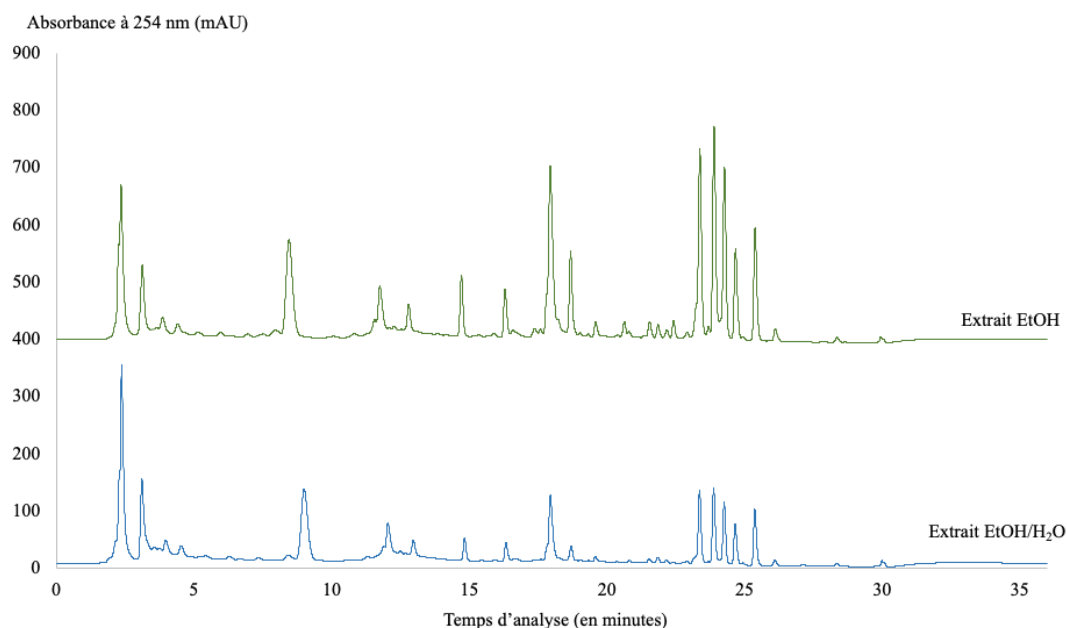


Figure IV-11 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de l'extrait éthanolique et éthanol/eau (60/40, v/v) du thuya par HPLC-DAD (gradient 1).

Un fractionnement bioguidé préliminaire a été effectué sur l'extrait éthanolique de thuya en utilisant le couplage HPLC – activité biologique développé, des fractions ont été collectées toutes les 30 secondes sur deux plaques différentes et l'activité antigerminative a été mesurée sur 2 graines par fraction. Ce fractionnement préliminaire a permis d'identifier une fraction active qui a été ré-analysée en HPLC – UV (**figure IV-12**). Cette fraction est enrichie en un composé ayant un temps de rétention de 18,0 minutes (1), mais contient également des composés avec des temps de rétention de 18,2 minutes (2), 18,3 minutes (3) et 19,4 minutes (4). Des analyses complémentaires sont nécessaires pour identifier la ou les molécules responsables de l'activité dans cet extrait.

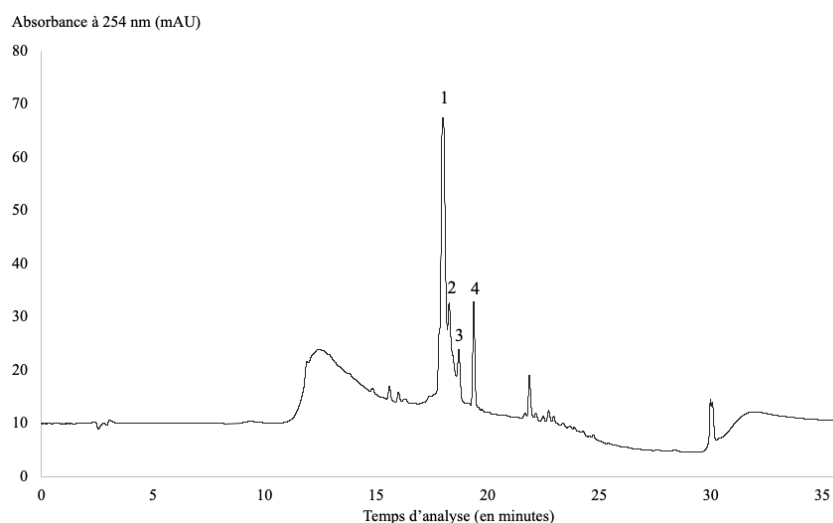


Figure IV-12 – Chromatogramme UV (à 254 nm) de la fraction active du thuya par HPLC-DAD (gradient 1).

#### **4. Conclusions :**

Le criblage de 7 plantes extraites avec 5 solvants de polarités différentes (35 extraits) a été réalisé grâce à la nouvelle méthode en plaque 96 puits. Ceci a permis de mettre en évidence le potentiel antigerminatif de 4 plantes (la potentille, les gaillets commun et gratteron et le thuya). Parmi les extraits de ces plantes, les extraits à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol sont les plus actifs.

La méthode développée précédemment en plaque 96 puits permet de discriminer les extraits actifs d'autres moins actifs et ainsi d'orienter les analyses vers ceux qui présentent le plus grand intérêt pour la recherche de composés bioherbicides.

Les analyses HPLC préliminaires de ces extraits d'intérêt montrent des profils riches qui nécessitent de poursuivre les investigations pour mettre en évidence le ou les composés responsables de l'activité observée. Le couplage utilisé pour l'IGR sera donc utilisé pour la suite du projet.

Le test de l'activité des autres plantes récoltées est en cours et permettra certainement de mettre en évidence d'autres extraits actifs. L'activité bioherbicide des plantes choisies renforce l'hypothèse selon laquelle les plantes invasives, adventices ou ornementales sont une bonne source de nouveaux candidats bioherbicides.



---

# CHAPITRE V

---



## Chapitre V - Conclusions générales et perspectives

---

Dans le contexte de croissance de la population mondiale et de la demande agronomique, l'utilisation des herbicides s'est accrue au XIX<sup>ème</sup> siècle. Après des années d'utilisation de ces produits phytosanitaires, des études ont mis en évidence leur toxicité tant sur l'Homme, l'environnement ou les espèces non ciblées comme les poissons ou les pollinisateurs et certains composés ont été retirés du marché. La demande en ressource alimentaire ne cessant d'augmenter, il est nécessaire de trouver des alternatives à ces produits toxiques qui soient plus respectueuses de l'environnement tout en permettant de conserver des rendements agricoles suffisants. Des initiatives gouvernementales ont été mise en place, avec notamment le plan EcoPhyto II+ en France pour favoriser le développement de produits de biocontrôle. Néanmoins, le nombre d'herbicides naturels d'origine végétale sur le marché reste faible.

Cette thèse avait comme objectif principal d'utiliser les ressources végétales pour identifier de nouvelles molécules phytotoxiques. Pour ce faire, le premier objectif a été de développer une nouvelle méthode de test en plaque 96 puits pour évaluer l'activité bioherbicide d'extraits ou de molécules pures. Le développement en plaque 96 puits a permis d'envisager un couplage HPLC – tests biologiques, dans le but d'accélérer l'identification des composés actifs. Le deuxième objectif a été d'étudier le potentiel phytotoxique des différents organes et cultures de cellules indifférenciées d'une plante invasive de la région Grand Est : la balsamine de l'Himalaya, plante modèle de ce projet. Enfin, le dernier objectif a été d'utiliser la méthode nouvellement développée pour évaluer le potentiel phytotoxique de diverses plantes invasives, ornementales ou adventices de la région et d'identifier les molécules responsables de cette activité.

Dans un premier temps, la méthode en plaque 96 puits a été développée en utilisant le cresson comme plante cible et les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus avec la méthode en boîte de Petri avec papier filtre utilisée comme référence. Plusieurs paramètres ont été optimisés avec notamment le contenant, le support mais également l'évaporation du solvant qui a été une étape limitante pendant plusieurs semaines. En effet avant d'utiliser l'évaporateur Speedvac la méthode n'a pas permis pas d'obtenir des résultats similaires à la méthode de référence en boîte de Petri. Lorsque les paramètres ont été optimisés, la méthode a été validée avec une molécule pure, la lawsone et en utilisant le modèle linéaire généralisé pour le traitement statistique des données. Cette validation a fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Flieller *et al.*, 2022). L'utilisation de la lawsone a permis de vérifier que le test en plaque 96 puits était adapté à l'évaluation de l'activité antigerminative d'une molécule pure. L'activité d'un extrait éthanolique de balsamine de

l'Himalaya a également été évaluée en utilisant la méthode en plaque 96 puits et en boîte de Petri pour vérifier la possibilité d'évaluer l'activité des mélanges complexes. Les résultats obtenus ont été similaires entre les deux méthodes. Ce test a ensuite été encore optimisé en diminuant le nombre de graines cibles nécessaires. La méthode en plaque 96 puits permet de réduire la masse d'extrait nécessaire par deux. En effet, pour une concentration en extrait de 5 mg/mL, seulement **3,6 mg et 36 graines sont nécessaires pour le test en plaque 96 puits contre 7,5 mg et 60 graines pour la méthode en boîte de Petri**. Cette réduction de la masse d'extrait nécessaire et du nombre de graines permet un gain de temps de manipulation non négligeable lorsque l'activité d'un grand nombre de plantes est évaluée.

Après validation et comparaison avec une méthode classique en boîte de Petri, le test en plaque 96 puits a été appliqué à 3 autres molécules : 2 herbicides : le glyphosate et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et une autre naphthoquinone la 2-méthoxy-1,4-naphthoquinone. Les profils d'inhibition de la germination du cresson ont été similaires entre les deux naphthoquinones testées alors que le glyphosate n'a pas eu d'activité. En effet, le glyphosate est un herbicide de post émergence qui agit sur les parties foliaires de la plante, il n'était pas aberrant qu'il n'ait pas d'impact sur la germination des graines de cresson. Le test développé est donc adapté à la mesure de l'activité de diverses molécules et permet également de discriminer celles n'ayant pas d'impact sur la germination des graines. D'autres espèces de plantes cibles ont ensuite été utilisées pour diversifier les cibles. Les plantes utilisées ont été à la fois une monocotylédone (le blé) et deux dicotylédones (le radis et la laitue) car certains herbicides sont sélectifs des monocotylédones par exemple. Ces plantes cibles ont montré des profils de sensibilités aux composés antigerminatifs différents avec une inhibition de la germination accrue pour les graines de laitue et de cresson.

La méthode développée permet en peu de temps d'évaluer l'activité de molécules en solution mais pas des composés volatils. De plus, les graines sont au contact d'une solution aqueuse contenant du Tween 20, mais il pourrait être intéressant de réaliser une solution aqueuse contenant du DMSO pour augmenter la solubilisation de certains composés présents dans les extraits les plus apolaires. Avec la méthode développée, l'activité des extraits à l'heptane et à l'acétate d'éthyle est peut-être sous-estimée. En utilisant cette méthode, le taux de germination des graines mais également des longueurs des racines a été mesurée. L'étude de la longueur des hypocotyles pourrait être effectuée. Les plantules pourraient également être collectées et séchées pour mesurer leur poids frais et sec qui est un paramètre évalué dans les études sur le potentiel allélopathique. En revanche, pour étudier plus en détails le développement des plantules, le contenant plaque 96 puits, est peu adapté car elles disposent de peu d'espace pour se développer. Ce test convient pour l'étude des premiers stades de développement des graines/plantules. La viabilité des graines peut également être évaluée avant le test pour réduire la proportion de graines non germées pour cause d'anomalie intrinsèque

avec des méthodes non destructives ou en évaluant le nombre de graines viables dans chaque lot en utilisant le test de viabilité au tétrazolium (França-Neto et Krzyzanowski, 2019).

L'application du test à d'autres graines cibles de familles botaniques différentes ou à des plantes adventices résistantes aux herbicides commerciaux est envisageable. L'utilisation des graines de plantes résistantes permettrait de tester les molécules/extraits directement sur celles-ci et ainsi d'essayer de contourner ces phénomènes de résistance. Néanmoins la culture de ces plantes en laboratoire peut s'avérer complexe car elles ne sont pas standardisées comme les graines commercialisées, ou ne sont pas disponibles à l'achat mais proviennent directement de plants sauvages ou de collections.

La méthode permettant de déterminer les extraits les plus actifs, la deuxième étape du développement de la méthodologie a été de mettre en place, pour la première fois, un couplage séparation HPLC - test antigerminatif, de façon à réaliser un fractionnement bioguidé. Ce couplage permet de caractériser rapidement les molécules actives en utilisant peu de matière première. Les paramètres de collecte, d'évaporation ont été optimisés et la méthode a été utilisée pour évaluer le potentiel allélopathique de la balsamine de l'Himalaya. Un fractionnement préliminaire réalisé toutes les 30 secondes a permis de mettre en évidence **quatre zones d'activité**. Le couplage a été optimisé en utilisant un détecteur UV – Visible. Il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres types de détecteurs permettant de réaliser un fractionnement différent sur la base du chromatogramme obtenu. De plus, dans un premier temps, un extrait éthanolique a été utilisé mais des extraits de polarité différentes pourraient être fractionnés en utilisant d'autres phases mobiles et stationnaire et en adaptant le temps d'évaporation du solvant dans l'évaporateur Speedvac. Le fractionnement bioguidé présente des avantages tant au niveau du gain de temps que de la mise en place mais également des inconvénients. En effet en fractionnant l'extrait il est possible de séparer des molécules qui agiraient en synergie et dont l'activité ne serait plus détectée après fractionnement. De plus, les faibles quantités d'extrait utilisées pour le microfractionnement ne permettent pas forcément de mettre en évidence l'activité de toutes les molécules de l'extrait, seules les molécules les plus actives ou les plus concentrées sont identifiées. De plus, l'HPLC préparative est à utiliser en parallèle du microfractionnement pour permettre l'identification de molécules présentes en trop faibles quantité dans les microfractions et tester ces molécules de façon plus approfondie, sur d'autres graines cibles ou pour les caractériser en masse ou en RMN

Le deuxième objectif a été d'étudier l'activité de la balsamine de l'Himalaya car même si son potentiel phytotoxique a déjà été décrit, le lien direct entre les molécules et l'activité phytotoxique de la plante n'a pas été démontré. En revanche, la présence de naphthoquinones (particulièrement la lawsone et la 2-MNQ) dans la plante étant déjà décrite ces molécules sont souvent considérées comme responsables de l'activité observée sans étape de fractionnement



bioguidé. Pour étudier le potentiel phytotoxique de cette plante, 6 extraits de polarités différentes des organes de la plante (feuilles, tiges, racines et fleurs) ont été réalisés et leur potentiel bioherbicide a été évalué en utilisant la méthode en plaque 96 puits. Les résultats obtenus pour les extraits de balsamine sont présentés dans le tableau bilan (**tableau V-1**). Parmi les 4 organes de la plante et les 35 extraits testés, seuls 11 extraits ont présenté un intérêt : les extraits de fleurs quel que soit le solvant et les extraits à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol des racines et des feuilles (indiqués en vert foncé dans le tableau). Les molécules à potentiel phytotoxique semblent être contenues dans les organes de la plante qui vont tomber au sol, ou dans les racines qui pourraient les libérer directement dans le sol. La plante a également été cultivée pour la première fois *in vitro* avec succès pour obtenir des plantules, des cals et des suspensions cellulaires. L'activité de l'extrait éthanolique de suspensions cellulaires a pu être testée mais l'extrait n'a présenté aucun impact sur la germination des graines de cresson. Le profil phytochimique a pu être effectué, montrant un extrait relativement pauvre en composés chimiques. La culture *in vitro* de la plante permet d'approfondir l'étude de ces mécanismes de développement et de colonisation du territoire mais également de réaliser des co-cultures avec d'autres plantes pour étudier leurs interactions en conditions contrôlées. L'obtention de plants d'IGR *in vitro* peut aussi être utilisée pour tester de nouvelles stratégies de contrôle biologique avec des tests de bioherbicides par exemple. Les suspensions peuvent quant à elles être utilisées pour produire des molécules d'intérêt en plus grande quantité grâce à des manipulations d'élicitation qui non pas pu être initiées dans ce projet par manque de temps.

L'extrait de feuille de balsamine a été analysé par le couplage HPLC analytique – test biologique. Parmi les 37 fractions collectées seulement 8 ont présenté une activité antigerminative sur les graines de cresson. Parmi certaines fractions actives, des composés ont pu être identifiés par une analyse des spectres d'absorbances des spectres de masse et l'utilisation de molécules standard comme la lawsone ou la 2-MNQ. L'hyperoside, l'isoquercétine et la lawsone ont été identifiés dans les fractions les plus actives mais sont présentes à des concentrations pour lesquelles leur activité n'a pas été démontrée. Si ces molécules participent à l'activité c'est donc plutôt en synergie avec d'autres molécules de l'extrait. Le couplage permet d'obtenir une première appréciation des molécules actives mais certaines molécules minoritaires pourraient également être actives sans être détectées par l'analyse chromatographique réalisée dans ce projet. Six naphtoquinones ont été caractérisées dans les fractions actives, comme la 2-MNQ et la lawsone, mais d'autres sont minoritaires dans l'extrait et leur identité est inconnue pour l'instant. L'identification des molécules actives dans un extrait végétal est un travail complexe car certaines molécules, comme la lawsone ou l'hyperoside, ne sont pas les molécules actives principales de l'extrait malgré leur présence non négligeable. De plus, certaines naphtoquinones actives sont minoritaires dans l'extrait ce qui complique leur identification. Il est probable que d'autres molécules participent à l'activité mais

ne soient pas en concentration suffisante pour être détectées lors du microfractionnement. Des analyses plus approfondies sont nécessaires pour identifier avec certitude les molécules actives.

De plus, seul l'extrait de feuilles d'IGR a été fractionné mais l'étude des extraits éthanoliques de fleurs, encore plus actifs, est en cours pour identifier les molécules responsables de l'activité dans un autre organe de la plante et comparer les zones actives lors du microfractionnement. Le test d'activité effectué sur les microfractions de l'extrait de feuille feuilles sera étendu en utilisant 12 graines par fractions au lieu de 4 pour s'assurer de l'activité des fractions, car comme discuté dans le chapitre 2 lors du développement de la méthode, au moins 10 graines sont nécessaires pour obtenir un taux de germination fiable.

Le dernier objectif de ce projet était d'évaluer le potentiel antigerminatif de plantes invasives, adventices ou ornementales vigoureuses. Durant cette thèse, une vingtaine de plantes ont été récoltées et 7 ont été testées à ce jour en plus des différents organes de l'IGR. Pour chaque plante 5 extraits ont été réalisés avec des solvants de polarité différentes et l'activité de chaque extrait a été évaluée à deux concentrations sur 36 graines de cresson. Au total, pour ce criblage la germination d'un peu plus de 4 000 graines a été étudiée.

Parmi les 35 extraits testés, 3 extraits ont montré une activité intéressante (similaire à une solution de lawsone à 0,083 mg/mL) : les extraits de potentille quintefeuille, de gaillet commun et de gaillet gratteron à l'acétate d'éthyle. Deux extraits ont présenté une activité intermédiaire avec une concentration en extrait de 5 mg/mL : l'extrait à l'acétate d'éthyle de pourpier commun et à l'éthanol de thuya (**tableau V-1**). Certaines plantes en revanche n'ont pas montré d'activité quel que soit le solvant utilisé comme la benoite commune ou ont montré une activité très faible comme le fraisier des Indes.

**Tableau V-1 – Activité des différents extraits de plantes testés sur les graines de cresson (en vert foncé les extraits présentant une activité similaire à la lawsone lors de l'utilisation d'un extrait à 5 mg/mL, en vert intermédiaire, les extraits présentant une activité intermédiaire lors de l'utilisation d'un extrait à 5 mg/mL et en vert clair, les extraits présentant une activité similaire à l'activité de la lawsone lors de l'utilisation d'un extrait à 20 mg/mL. Les cases grisées correspondent à des extraits non traités.**

	<i>Impatiens glandulifera</i> Royle					Criblage						
	Fleurs	Tiges	Racines	Feuilles	Suspensions	Benoite commune	Potentille quintefeuille	Pourpier commun	Thuya	Gaillet commun	Gaillet gratteron	Fraisier des Indes
Heptane	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
AcOEt	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EtOH	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
EtOH/H2O	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
H2O	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Isopropanol	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Les extraits actifs de potentille et de thuya ont été analysés en HPLC mais les molécules actives n'ont pas encore été identifiées. Un couplage séparation HPLC – test biologique doit être effectué pour mettre en évidence les molécules actives de ces 2 plantes, ainsi que celles contenues dans les 2 espèces de gaillets. En parallèle, le potentiel phytotoxique des 10 plantes récoltées restantes doit être évalué au laboratoire.

L'utilisation du test en plaque 96 puits a permis de déterminer rapidement les extraits les plus actifs de différentes plantes, sur la germination et la croissance des racines. Les extraits d'intérêt pourraient être testés sur la germination d'autres graines cibles et le couplage HPLC – test biologique va être mise en pratique pour le fractionnement de plusieurs extraits de polarité différentes. En effet, pour les plantes testées, les extraits les plus actifs sont les extraits à l'acétate d'éthyle et à l'éthanol. A ce jour, seul un extrait à l'éthanol a été fractionné.

Grâce à la méthode en plaque 96 puits, il est possible de tester l'activité de plusieurs plantes de manière standardisée et rapide, l'activité phytotoxique d'autres plantes pourrait également être testée à l'avenir. Néanmoins, après identification des composés actifs des tests complémentaires sont nécessaires, comme des tests de cytotoxicité, de toxicité pour les pollinisateurs mais également l'étude de la dégradation des composés dans le sol. De plus, les mécanismes d'action de ces composés peuvent être évalués avec des études physiologiques. Enfin l'étude de l'activité des composés purs, de mélanges de composés voire de mélanges de fractions enrichies ou d'extraits pourrait être évaluée pour permettre de contourner les phénomènes de résistance avec des approches multicibles, et une étape de formulation sera envisagée pour la commercialisation des candidats bioherbicides.

Pour conclure, ce projet a permis d'ouvrir le champ des possibles dans la découverte de molécules à potentiel herbicide grâce à une méthode innovante, rapide et validée qui permet d'évaluer le potentiel antigerminatif d'une multitude de plantes et d'identifier les molécules actives. Ce projet de thèse par son aspect pluridisciplinaire a été très enrichissant d'un point de vue personnel mais également professionnel avec une partie validation de méthodes et statistiques mais également une partie chimie analytique et identification de métabolites actifs ainsi qu'un aspect culture *in vitro* de la plante modèle de l'étude.

---

# Chapitre VI

---



## Chapitre VI - Matériel et méthodes

**1. Tests antigerminatifs et criblage :****1.1 Provenance des solvants, étalons, réactifs et références des appareils :****Tableau VI-1 – Provenance des étalons, solvants, réactifs et appareils utilisés pour la mise au point du test en plaque 96 puits**

	Produit	Fournisseur
Étalons, solvants et réactifs	2-MNQ	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
	2-propanol	Carlo Erba (Val-de-Reuil, France)
	2,4-D	Duchefa Biochemie (Haarlem, Pays Bas)
	Acétate d'éthyle	Fisher (Illkirch Graffenstaden, France)
	Acide formique	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
	Éthanol	Fisher (Illkirch Graffenstaden, France)
	Glyphosate	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
	Heptane	Fisher (Illkirch Graffenstaden, France)
	Hyperoside	Merck, Darmstadt, Allemagne
	Isoquercétine	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
	Kaempférol-3-O-glucoside	Extrasynthèse (Genay, France)
	Lawson	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
	Tween 20	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
Appareils utilisés	Boite de Petri (50 mm de diamètre)	VWR (Rosny Sous-Bois, France)
	Centrifugeuse	Beckman CS-15R
	Lyophilisateur	LabConco Freezone
	Papier filtre 47 mm Whatman™	VWR (Rosny Sous Bois, France)
	Plaque 96 puits avec couvercle	Thermo Fisher Scientific (Illkirch Graffenstaden, France)
	Évaporateur rotatif, pompe à vide, bain marie, interface	Büchi – R-114, V-100, B-480, I-100
	Speedvac	Thermo Scientific, Savant SPD121P
	Système eau Ultra Pure	Merck Millipore (Molsheim, France).
	Appareil photo	Lumix DHC GH3
	Macroscopie	Leica

**1.2 Tests antigerminatifs – Mise au point de la méthode :****1.2.1 Graines utilisées :**

Les graines de cresson alénois (*L. sativum* L.), de laitue (*L. sativa* L.), de radis (*R. sativus* L.), de blé (*T. aestivum* L.), de pourpier maraîcher (*P. oleracea* L.), d'avoine (*A. sativa* L.), de pissenlit (*Taraxacum* Weber ex F.H. Wigg.), de millet (*P. miliaceum* L), de ray grass (*L. perenne* L.) ont été achetées dans une jardinerie.

## 1.2.2 Tests préliminaires :

### 1.2.2.1 Test agar :

L'agar a été dilué dans de l'eau distillée à raison d'une concentration de 1% (m/v), puis mis à chauffer jusqu'à ébullition. Il a été laissé à refroidir à une température permettant le pipetage tout en étant encore liquide. 100  $\mu$ L ont été placés dans chaque puits, puis l'agar s'est solidifié et une graine de cresson a été déposée par puits. Les graines ont été mises à germer dans une enceinte de culture à 25°C avec une photopériode 16 h de jour et 8 h de nuit. Au bout de 48 h la germination des graines a été évaluée en mesurant la taille des radicules à l'œil nu, en dessous de 1 mm la graine n'était pas considérée comme germée.

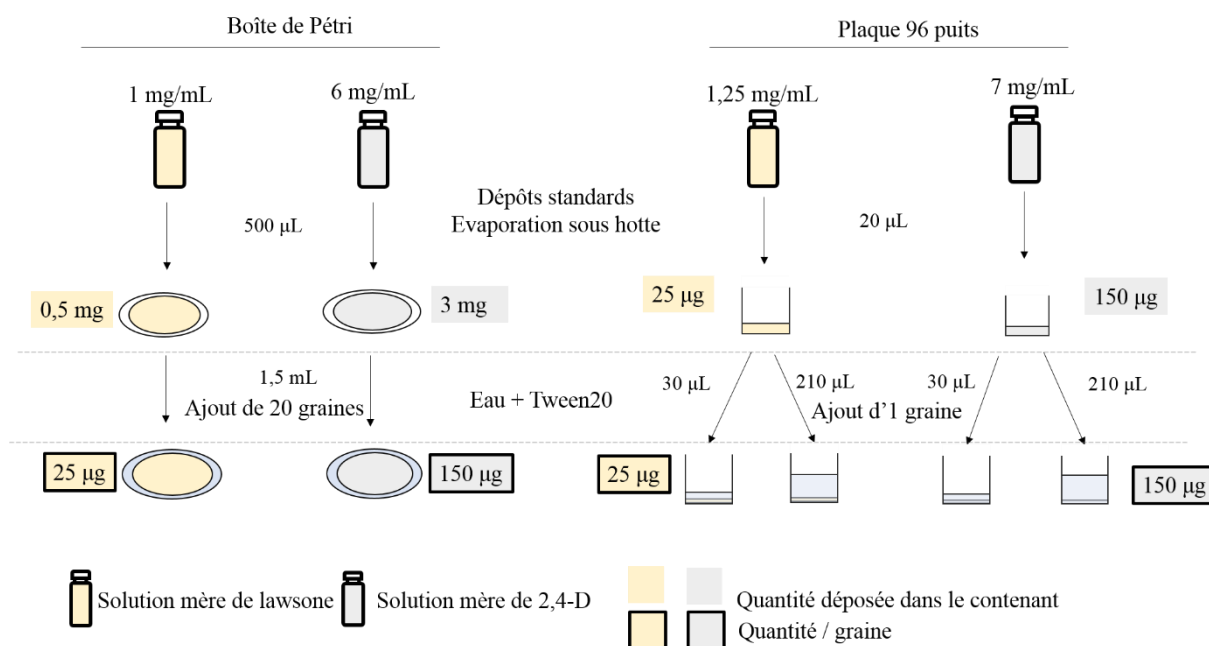
Pour tester l'impact du solvant, des solutions ont été testées : isopropanol/eau (50/50, v/v), éthanol/eau (60/40, v/v) et eau. 10  $\mu$ L de chaque solution a été déposée dans un puits et 90  $\mu$ L d'agar à 0,05% a été ajouté. Les graines ont été placées dans une enceinte de culture à 25°C avec une photopériode 16 h de jour et 8 h de nuit. La germination des graines a été évaluée dès 17 h d'incubation jusqu'à 94 h à l'œil nu sans sortir les graines des puits.

### 1.2.2.2 Évaluation du potentiel antigerminatif de molécules témoins :

En plaque 96 puits, 20  $\mu$ L de solution de lawsone à 1,25 mg/mL (7 mmol/L) et de 2,4-D à 5 mg/mL (22 mmol/L) ont été déposés dans chaque puits, puis les plaques ont été laissées sous la hotte pendant 1h. Lors de l'utilisation de papier filtre, du papier Whatman a été découpé grâce à une perforatrice, un papier filtre a été placé dans chaque puits, puis 10  $\mu$ L de solution de lawsone (à 2,5 mg/mL, 14 mmol/L) et de 2,4-D (à 10 mg/mL, 44 mmol/L) ont été déposés sur chaque puits. Une fois les solvants évaporés 30  $\mu$ L d'une solution eau + Tween 20 (0,05%) ont été ajoutés. Les graines ont été laissées à germer pendant 48 h dans l'enceinte de culture et la germination des graines a été évaluée à l'œil nu.

### 1.2.2.3 Volume de resubilisation :

Pour le test en boîte de Petri, la concentration de la solution mère de lawsone est de 1 mg/mL (5,7 mmol/L) et de 2,4-D de 6 mg/mL (27 mmol/L) et pour le test en plaque 96 puits, elle est de 1,25 mg/mL (7 mmol/L) pour la lawsone et de 7,5 mg/mL (33,9 mmol/L). Le protocole suivi est décrit dans la **figure VI-1**, les quantités disponibles par graine dans les boîtes et dans les plaques sont égales.



**Figure VI-1 – Protocole des tests antigerminatifs permettant de faire varier le volume de resolubilisation en conservant la même masse de standards.**

#### 1.2.2.4 Techniques d'évaporation :

Pour tester les techniques d'évaporation, les solutions de lawsone et de 2,4-D ont été préparés à 1,25 et 7 mg/mL permettant d'avoir une quantité dans les puits de 25 µg pour la lawsone et de 150 µg pour le 2,4-D en déposant 20 µL dans chaque puits. Les plaques ont été mises au Speedvac, un évaporateur sous vide, pendant 30 minutes à 35 °C. Puis 60 µL de solution eau + Tween 20 (0,05%) ont été ajoutés. Les graines ont ensuite été mises à germer dans l'enceinte de culture à 25°C pendant 48 h.

#### 1.2.2.5 Mesure de la germination des graines de cresson :

Avec la méthode en plaque 96 puits, la mise en place d'un système de prise de vue à l'aide d'un stéréo-microscope et d'un appareil photo. Cela permet de bien visualiser la taille des graines peu germées sans sortir les graines de la plaque dans un premier temps, et d'obtenir un taux de germination des graines de cresson. Dans les rares cas pour lesquels la germination d'une graine n'était pas visible, il était également possible de la sortir du puits et de reprendre une photo sous un meilleur angle.

Le logiciel ImageJ est utilisé pour mesurer la taille des racines des graines peu germées. Tout d'abord l'échelle des photographies est précisée grâce à la photographie d'une feuille de papier millimétré (**figure VI-2**) au même grossissement que les photographies des graines (Fonction Calibration > Set Calibration). Les photographies sont ensuite visualisées les unes après les autres. Si les graines sont germées et sous forme plantules, la longueur de la racine



n'est pas mesurée à cette étape utilisant le microscope, en revanche si la graine est peu germée la radicule est mesurée (Fonction freehand lines pour indiquer la radicule et Analyse > Mesure pour donner une valeur à la ligne tracée) (**figure VI-2**). Lors de l'évaluation de l'impact des échantillons sur l'élongation racinaire, toutes les racicules sont mesurées.

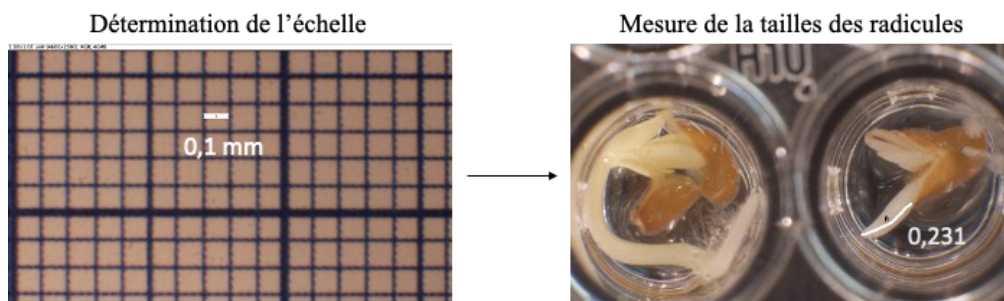


Figure VI-2 – Mesure de la taille des racicules des graines de cresson dans les plaques 96 puits

### 1.3 Tests antigerminatifs – application de la méthode :

#### 1.3.1 Utilisation de différentes graines cibles et molécules testées :

Les conditions de germination de différentes graines cibles ont été testées en suivant les modalités présentées dans le **tableau VI-1**. Les graines ont été déposées sur un papier filtre imbibé avec 2 mL d'eau distillée, ou directement dans les puits d'une plaque 96 puits contenant 60  $\mu$ L d'eau. Le taux de germination a été évalué toutes les 24 h.

Tableau VI-2 – Conditions de germination des différentes graines cibles.

Plante	Contenant	Nombre de graine	Conditions de culture
Pourpier	Boite de Petri 5 cm, papier filtre	20 graines 2 boites par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C
Pissenlit	Boite de Petri 5 cm, papier filtre	20 graines 3 boites par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C
Laitue	Plaque 96 puits	32 graines 2 plaques par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C
Radis	Plaque 96 puits	96 graines 1 plaque par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C
Millet commun	Boite de Petri 5 cm, papier filtre	20 graines 2 boites par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C
Ray grass	Boite de Petri 5 cm, papier filtre	20 graines 2 boites par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C
Blé tendre	Boite de Petri 5 cm, papier filtre	20 graines 3 boites par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C
Avoine noire	Boite de Petri 5 cm, papier filtre	20 graines 3 boites par conditions	Photopériode 16/8, 25°C Obscurité, 25°C

Les différentes molécules testées : le glyphosate, 2,4-D et 2-MNQ ont été préparées à 3 mmol/L dans un solvant approprié qui était l'eau pour le glyphosate et l'éthanol pour le 2,4-D

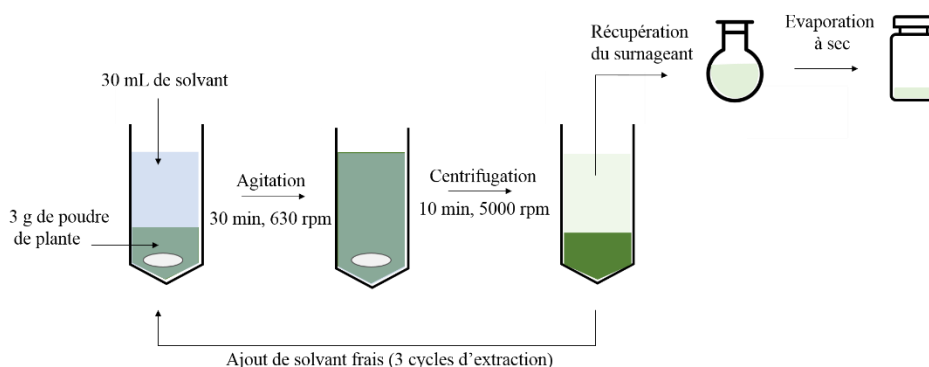
et la 2-MNQ. Leur activité a été testée avec la méthode en plaque 96 puits développée précédemment.

### 1.3.2 Évaluation de l'activité phytotoxique de la balsamine et d'autres plantes invasives, adventices ou ornementales

#### 1.3.2.1 Matériel végétal et extraction :

Les plants de balsamine de l'Himalaya (*Impatiens glandulifera* Royle) ont été récoltés dans le haut Rhin près de Mulhouse et les parties aériennes des autres plantes testées ont été récoltées dans le bas Rhin en France. Pour chaque plante récoltée, un spécimen d'herbier a été conservé et la plante a été identifiée par une botaniste du Jardin botanique de l'université de Strasbourg). Après la récolte, les plantes ont été conservées à -80°C pour éviter toute dégradation. Les plantes congelées ont ensuite été cryobroyées en utilisant de l'azote liquide, puis lyophilisées et broyées au moulin à café pour obtenir une poudre fine conservée au congélateur avant utilisation.

La poudre de plante sèche a ensuite été extraite avec des solvants de polarités différentes : l'heptane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, un mélange éthanol/eau (60/40, v/v), l'eau et l'isopropanol pour les différents organes de la balsamine de l'Himalaya et l'heptane, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, un mélange éthanol/ eau (60/40, v/v), l'eau pour les autres plantes testées. La procédure d'extraction utilisée pour toutes les plantes est la même et est décrite dans la **figure VI-3**. Les suspensions cellulaires ont subi 3 cycles d'extraction avec de l'éthanol.

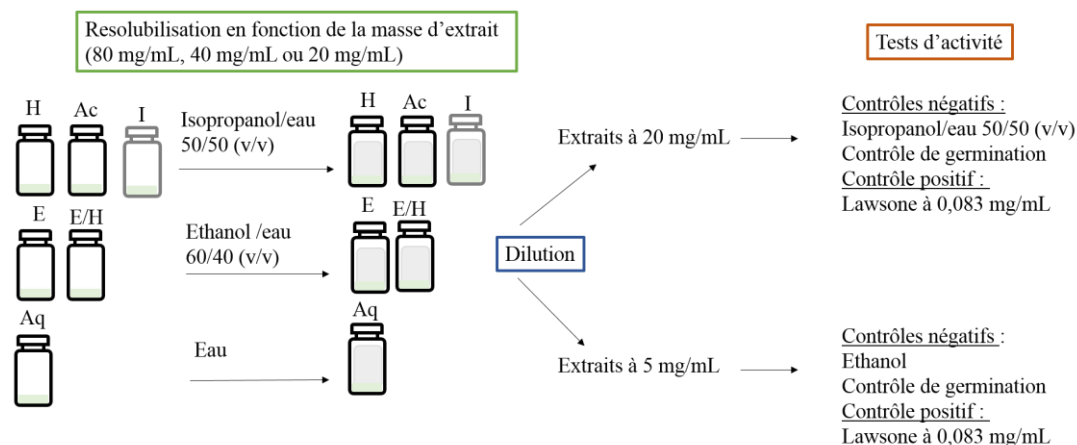


**Figure VI-3 – Protocole d'extraction utilisé pour l'extraction des échantillons de plantes**

#### 1.3.2.2 Évaluation de l'activité des extraits de plantes :

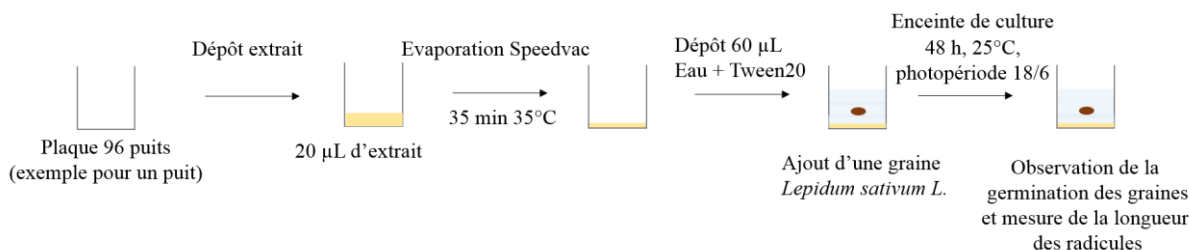
Les extraits secs sont préparés pour leur utilisation dans les tests de mesure de l'activité bioherbicide de la façon suivante (**figure VI-4**). Des contrôles négatifs sont réalisés d'une part pour évaluer l'impact du solvant (isopropanol/eau (50/50 v/v) ou éthanol) et d'autre part pour évaluer la germination des graines dans une solution eau + Tween 20 (contrôle de germination).

De plus un contrôle positif avec de la une solution de lawsone à 0,25 mg/mL (0,47 mmol/L) est réalisé.



**Figure VI-4 – Protocole de préparation des extraits avant d’effectuer les tests d’activité. Extraits à l’heptane (H), à l’acétate d’éthyle (Ac), à l’isopropanol/eau : 50/50 (v/v) (I), éthanolique (E), à l’éthanol/eau 60/40 (v/v) (E/H), aqueux (Aq).**

Le test d’activité bioherbicide en plaque 96 puits est réalisé de la même manière pour tous les extraits et suivant le protocole présenté dans le chapitre 2 du manuscrit avec le protocole ci-dessous, **figure VI-5** :



**Figure VI-5 – Protocole du test optimisé et validé utilisé pour l’étude du potentiel phytotoxique des extraits de plantes.**

## 2. Analyse phytochimique des extraits et couplage :

### 2.1 HPLC analytique :

Pour les analyses chromatographiques, une chaîne d’HPLC Dionex (Ultimate 3000, Thermo scientific) équipée d’une pompe, d’un injecteur automatique avec passeur d’échantillons permettant de réaliser la collecte des fractions et d’un détecteur à barrette de diodes équipé d’une lampe UV a été utilisée. Le logiciel utilisé pour l’acquisition et le traitement des données obtenues est Chroméléon (version 6,80 SR15). Les solvants utilisés comme phase mobile sont : A : eau + 0,1% acide formique (v/v) et B : acétonitrile. La colonne utilisée est une colonne Nucleodur Sphinx C18 (150 x 3 mm, 3µm). Le débit de phase mobile

est de 0,3 mL/min et le gradient utilisé pour l'analyse des extraits en HPLC est décrit dans le **tableau VI-2**.

**Tableau VI-3 – Gradient utilisé pour l'analyse des extraits et des molécules pures utilisant l'HPLC analytique**

Gradient 1	
Temps d'analyse (minutes)	Pourcentage de solvant B
0 - 5	20
5 - 20	20 -100
20 - 25	100
25- 27	100 -20
27 -37	20

Les extraits sont injectés soit à 5 mg/mL avec un volume d'injection de 5  $\mu$ L pour l'obtention des profils chromatographiques (à 254, 270, 320 et 360 nm), soit à 20 mg/mL avec un volume de 20  $\mu$ L lors du microfractionnement pour la collecte en plaque 96 puits. La collecte a été réalisée toutes les 30 secondes, de 0 à 20 minutes d'analyse. Pour réaliser les profils chromatographiques des microfractions, 2 collectes identiques ont été regroupées afin d'obtenir un volume suffisant dans les vials et les fractions obtenues ont été analysées en injectant 20  $\mu$ L en utilisant le gradient 1.

Concernant les molécules de référence analysées avec le gradient 1, les solutions d'hyperoside et d'isoquercétine à 0,2 mg/mL ont été préparé en diluant une solution à 1 mg/mL dans de l'éthanol, 5  $\mu$ L ont été injectés en mode full loop La solution de kampférol 3 glucoside a été préparée en solubilisant de la poudre présente dans un pot du standard (mais en trop petite quantité pour être pesée), la concentration est donc inconnue, 5  $\mu$ L ont été injectés en mode full loop.

Les solutions d'2-MNQ et de lawsone ont été injectée à 5  $\mu$ L pour une concentration de 0,2 mg/mL La gamme étalon de lawsone et de 2-MNQ est préparée de façon à contenir les 2 molécules en mélange, 6 points de gamme sont définis : 0,0025 ; 0,05 ; 0,02 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 mg/mL en diluant une solution initiale à 1 mg/mL dans de l'éthanol.

## **2.2 HPLC préparative :**

La méthode analytique développée sur la colonne Nucleodur Sphinx C18 (150 x 3 mm, 3 $\mu$ m) a dû être adaptée sur la colonne Kinetex C18 de dimensions 100 mm x 3 mm, 2,6  $\mu$ m

préalable à la transposition en HPLC préparative. Deux gradients de phases mobiles différents ont été développés et sont présentés dans le **tableau VI-3**, toujours en utilisant la chaîne d'HPLC Dionex avec les mêmes solvants A et B et le même débit de phase mobile.

**Tableau VI-4 – Gradients utilisés pour la transposition entre HPLC analytique et HPLC préparative.**

HPLC analytique				HPLC préparative	
Gradient 2		Gradient 3		Gradient 4	
Temps d'analyse (minutes)	Pourcentage de solvant B	Temps d'analyse (minutes)	Pourcentage de solvant B	Temps d'analyse (minutes)	Pourcentage de solvant B
0 – 7	20 -100	0-3	20-50	0 - 6	20 - 100
7 - 8	100	3-4	50	6 - 10	100
8 – 8.5	100 - 20	4-6	50-100		
8,5 – 9,5	20	6-7	100		
		7-7,5	100-20		
		7,5 -8,5	20		

Le fractionnement des extraits a ensuite été réalisé grâce à une chaîne d'HPLC préparative Gilson, comprenant une pompe Gilson 322, une boucle d'injection de 2 mL montée sur une vanne d'injection manuelle, un détecteur UV/Vis 151 Gilson réglé à 254 nm et un collecteur automatique de fractions FC 204 Gilson. La colonne utilisée est une colonne Axia Kinetex C18 de dimensions 100 x 21,20 mm, 5 µm. Le gradient utilisé est le gradient 4 (**tableau VI-3**).

L'extrait éthanolique d'IGR a été solubilisé à 40 mg/mL dans un mélange correspondant aux conditions initiales utilisées en début de gradient (Eau + 0,1% acide formique / Acétonitrile (80/20 ; v/v)), puis filtré à l'aide d'un filtre seringue en PET de 0,45 µm. Le volume d'injection est de 1 mL avec un débit de phase mobile de 15 mL/min (gradient 4). Les fractions ont été collectées toutes les 30 secondes, ce qui permet d'obtenir 20 fractions de 7,5 mL. Le solvant est évaporé à l'aide d'un turbovac et d'un flux d'azote. Les fractions sèches sont pesées et resolubilisées dans 200 µL d'éthanol. 20 µL de fraction est placé dans 3 puits distincts pour évaluer la germination des graines de cresson en contact avec les composés obtenus. La manipulation est réalisée en duplicat. Des témoins négatifs ont été également déposés sur la plaque à savoir 12 graines en contact avec de l'éthanol et 12 sans ajout de solvant. Le témoin positif était une solution de lawsone à 0,083 g/mL. Au bout de 48 h, la germination des graines a été évaluée le nombre de graines germées a été dénombré sur les 2 plaques pour une fraction donnée.

L'analyse par HPLC analytique de ces fractions a été effectuée en utilisant le gradient 1 et les conditions détaillées dans la **partie 2.1 de ce chapitre** et dans le **tableau VI-2**.

### 2.3 Spectrométrie de masse :

Pour les analyses en spectrométrie de masse, un système UPLC Aquity (Waters) couplé à un spectromètre de masse microTOF QII (Bruker) a été utilisé. Les paramètres d'analyse chromatographiques sont les mêmes que pour l'HPLC analytique. La source utilisée est une source à électrospray (ESI) et l'analyseur est un quadripôle couplé à un temps de vol. Le logiciel utilisé pour l'acquisition des données est le logiciel HyStar (version 3.2). Le logiciel utilisé pour le traitement des données de masse est DataAnalysis (version 4.0.234.0). Les paramètres utilisés pour les analyses en spectrométrie de masse sont décrits dans le **tableau VI-4**.

**Tableau VI-5 – Paramètres utilisés pour les analyses en spectrométrie de masse**

Mode d'ionisation	Positif
Plage de $m/z$ balayée	50 – 1500
Fréquence d'acquisition	2 spectres par seconde
Voltage du capillaire	4500 V
Gaz de désolvatation et de nébulisation	N <sub>2</sub>
Débit de gaz de désolvatation	8,5 L/h
Pression du gaz de nébulisation	34,6 psi
Température de la source	200 °C
Energie de collision	10,0 eV

Pour les analyses en MS/MS, le mode AutoMSMS a été utilisé avec un mode de fragmentation de type DDA. 2 précurseurs par cycle ont été sélectionnés avec un seuil d'intensité minimal absolu de 2 000.

### 3. Analyses statistiques :

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel R (R- 4.0.3), avec un seuil de significativité  $\alpha = 0,05$ . La répétabilité et la fidélité intermédiaire ont été calculées en utilisant des écart types dans les jours et entre les jours obtenus par l'analyse de la variance. Pour comparer les résultats obtenus entre différentes méthodes et concentrations, le test post hoc de comparaison multiple a été effectué en utilisant le modèle linéaire généralisé (fonction glm()) pour les données binomiales et le test de Tukey (multcomp R package).

Les taux de germination ont été exprimés en moyenne, les écart types et les erreurs types de la moyenne (en anglais Standard Error to the Mean : SEM) ont été calculés en utilisant Microsoft Excel. Les erreurs type de la moyenne sont calculées comme suit :

$$\text{erreur type de la moyenne} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

avec s : l'écart type et n le nombre de réplicats (dans le cas des tests réalisés en 3 plaques).

Pour les comparaisons des taux de germination entre les extraits et les longueurs racinaires, le test post hoc de comparaison multiple a été effectué en utilisant le modèle linéaire généralisé (fonction glm()) pour les données binomiales et le test de Tukey (multcomp R package).

#### 4. Culture *in vitro* :

##### **4.1 Provenance des solvants, étalons, réactifs et références des appareils :**

**Tableau VI-6 – Provenance des constituants des milieux de culture et des appareils utilisés pour la culture *in vitro***

	Produit	Fournisseur
Composants des milieux de culture	ANA	Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays Bas
	BAP	Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays Bas
	KIN	Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays Bas
	IBA	Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays Bas
	Sucrose	Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays Bas
	MS + vitamines	Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays Bas
	PPM	Plant Cell Technology, Washington DC, Etats Unis
	Tween 20	Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France)
Appareils et matériel utilisés	Boîte Magenta (75 x 75 x 102 mm)	Dutscher, Bernolsheim, France
	Boîte de Petri	Dutscher, Bernolsheim, France
	Chambre de culture (MLR 352)	Panasonic
	Hotte à flux laminaire horizontal HERAguard Eco	Thermo Fisher Scientific (Illkirch Graffenstaden, France)
	Agitateur rotatif, MIR- S100	Panasonic
	TurboVap ® LV	Biotage (Uppsala, Suède)
	Evaporateur sous flux d'azote (Stuart, SBHCONC/1)	Dutscher, Bernolsheim, France

## **4.2 Germination des graines d'Impatiens glandulifera :**

### **4.2.1 Milieux utilisés :**

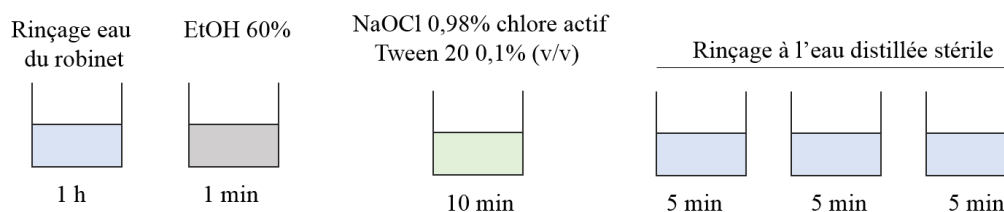
Pour la germination des graines d'IGR, le milieu solide utilisé est composé de milieu MS + vitamines (Murashige and Skoog 1962) à 4,4 g/L et de sucrose à 3% (m/v). Le pH a été ajusté à 5,7 avec une solution de NaOH à 1N. De l'agar à 0,8% (m/v) a été ajouté au milieu avant l'autoclavage (20 minutes à 120°C). Après l'autoclave, les milieux ont été mis à refroidir puis 100 mL de milieu encore liquide ont été prélevés et déposés dans des boîtes Magenta stériles de dimensions sous hotte. Pour permettre aux milieux de se solidifier, les boîtes de Petri ont été laissées ouvertes sous hotte pendant quelques heures, avant d'être emballées dans du papier aluminium et d'être stockées à 4°C.

### **4.2.2 Protocole de stérilisation :**

Pour la stérilisation des graines d'IGR, différentes solutions ont été préparées. De l'eau de Javel commerciale (9,8% de chlore actif) a été diluée au 1/10 avec de l'eau permettant d'obtenir une solution contenant 0,98% de chlore actif ou au ¼ permettant d'obtenir une solution contenant 2,5% de chlore actif. Du Tween 20 a ensuite été ajouté à ces solutions pour obtenir une concentration finale de 0,1% v/v.

### **4.2.3 Protocole de stérilisation 1 :**

Le premier essai concernant la stérilisation des graines d'IGR (12 graines) a été fait en suivant le protocole ci-dessous (**figure VI-6**).



**Figure VI-6 – Protocole de stérilisation des graines d'IGR dans des boîtes Magenta stériles**

Pour mettre au point les conditions optimales de germination des graines d'Impatiens, ces dernières ont été placées sur des milieux soit gélosés si elles ont été stérilisées soit sur du papier filtre imbibé d'eau si elles n'étaient pas stérilisées. La période d'exposition au froid est variable de 4 à 23 jours. Les graines stérilisées sont directement placées dans l'enceinte de culture après la durée d'exposition et celles non stériles sont ensuite stérilisées puis mise dans l'enceinte de culture (**Figure VI-7**).



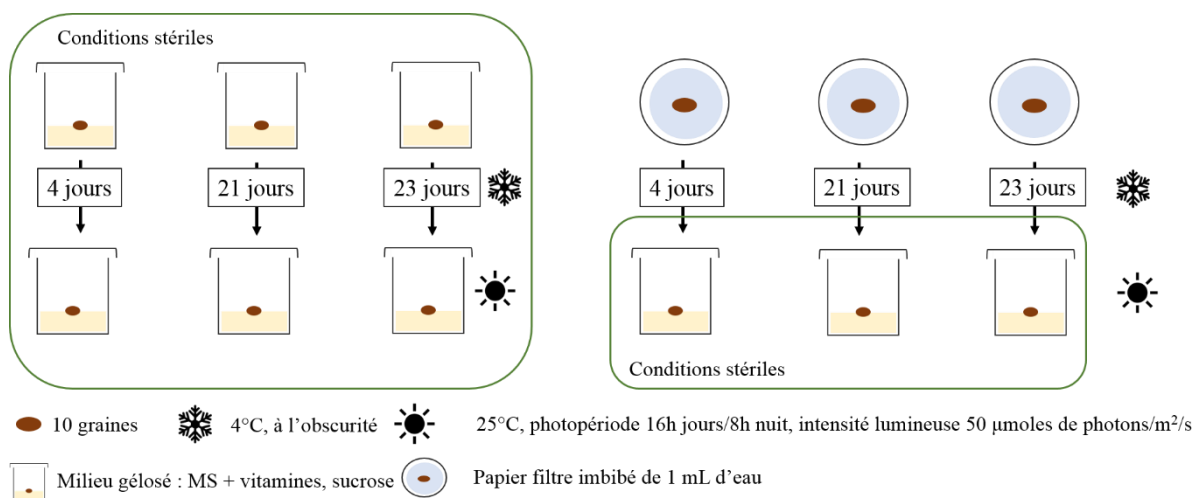


Figure VI-7 – Mise en culture des graines d’IGR après le protocole de stérilisation 1

#### 4.2.4 Protocole de stérilisation 2 :

Le second protocole de stérilisation testé est décrit dans la figure VI-8. Trois stérilisations différentes ont été testés pour permettre la germination des graines : les graines ont été mises à germer soit sans stérilisation soit après une stérilisation utilisant de l’eau de Javel à 0,98% avec du Tween 20 (0,1%) ou encore en utilisant une solution de PPM 4%. Pour chaque stérilisation 20 graines ont été placées dans 3 boîtes de Petri carrées différentes.

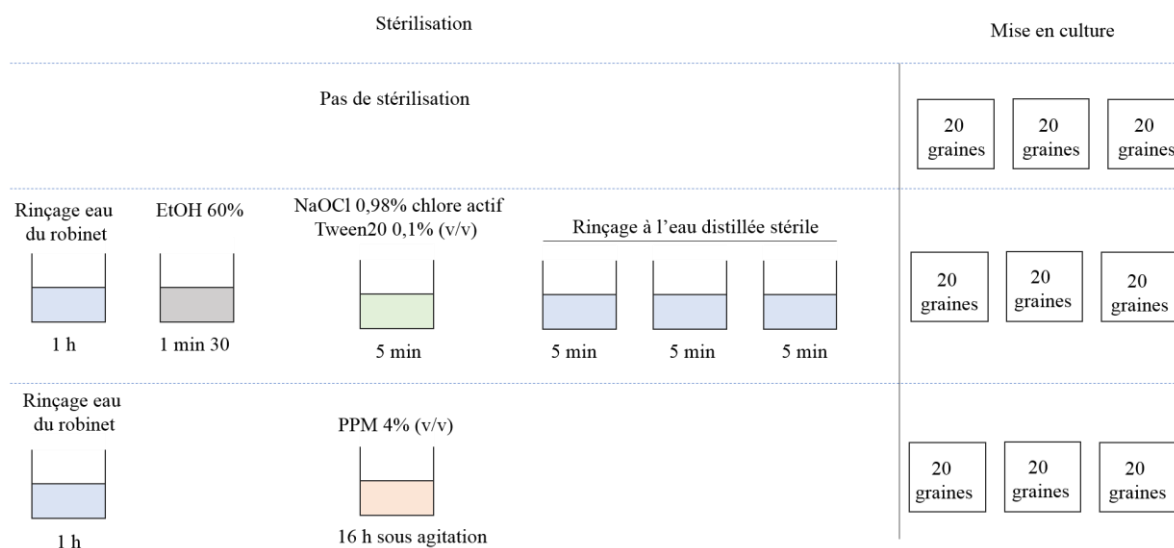


Figure VI-8 – Protocole de stérilisation 2 des graines d’IGR dans des boîtes Magenta stériles

### 4.3 Callogenèse :

#### 4.3.1 Milieux utilisés :

Pour la callogenèse, le milieu solide est composé de milieu MS + vitamines (Murashige and Skoog 1962) à 4,4 g/L et de sucrose 3% (m/v). Les hormones sont ajoutées en fonction de

la balance hormonale souhaitée : ANA (1 mg/mL) / BAP (0,5 mg/mL), ANA (1,5 mg/mL)/BAP (0,5 mg/mL) ou 2,4-D (1,5 mg/mL)/BAP (0,5 mg/mL). Lorsque du PPM (Plant Preservative Mixture) a été ajouté, une concentration de 0,1% (v/v) a été préparée. Le pH a ensuite été ajusté à 5,7 avec une solution de NaOH à 1N. De l'agar à 0,8% (m/v) a été ajouté au milieu avant autoclavage (20 minutes à 120°C). Après l'autoclave, les milieux ont été mis à refroidir puis 25 mL de milieu encore liquide ont été prélevés et déposés dans des boîtes de Petri stériles de 9 cm de diamètre. Pour permettre aux milieux de se solidifier, les boîtes de Petri ont été laissées ouvertes sous hotte pendant quelques heures, avant d'être emballées dans du papier aluminium et d'être stockées à 4°C.

#### 4.3.2 Protocole de stérilisation :

Pour la mise en culture des explants d'IGR (racines, feuilles et tiges), des plants juvéniles ont été récoltés à Gerstheim (Bas Rhin, Alsace) au mois de juillet 2020. Les feuilles ont été stérilisées suivant le protocole ci-dessous (figure).

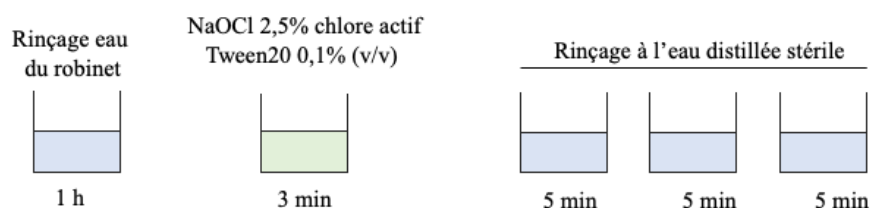


Figure VI-9 – Protocole de stérilisation des explants foliaires pour la mise en culture dans le but d'obtenir des cals.

#### 4.3.3 Mise en culture et repiquage :

Les feuilles sont ensuite coupées en morceaux de 1 cm<sup>2</sup> environ et déposées sur le milieu de culture. 3 milieux sont testés contenant tous du PPM (0,1% v/v), un milieu sans hormone, un milieu 2,4-D/BAP (1,5/0,5) et ANA/BAP (1,5/0,5). 6 explants sont déposés par boîte et 5 boîtes sont réalisées par milieu de culture. L'expérience est répétée 3 fois au cours du mois de juillet 2020.

Le repiquage des cals a été effectué toutes les 4 semaines. Pour cela, les cals à repiquer ont été divisés en cals d'environ 3-4 mm<sup>2</sup> en ne sélectionnant que les parties les plus claires et les plus friables. Ces petits cals étaient ensuite déposés sur un milieu frais dans une nouvelle boîte de Petri.

#### **4.3.4 Taux de contamination et aire des cals :**

Le taux de contamination a été évalué en dénombrant le nombre d'explants sur lesquels des champignons ou des bactéries se développaient par rapport au nombre d'explants utilisés pour l'expérience.

$$\text{Taux de contamination (\%)} = \frac{\text{nombre d'explants contaminés}}{\text{nombre d'explants mis en culture}}$$

La moyenne des taux de contamination pour chaque milieu ainsi que les écart types associés ont été calculés.

L'aire de chaque cal a été évaluée en utilisant le logiciel ImageJ et la fonction freehand sélection pour indiquer les cals et Analyse > Measure pour donner une valeur à l'aire de la sélection.

#### **4.3.5 Courbe de croissance :**

La courbe de croissance des cals a été réalisée grâce à 3 boîtes de Petri contenant chacune 4 cals pour la lignée 1 et 4 boîtes de Petri contenant chacune 4 cals pour la lignée 2. Tous les 7 jours chaque cal était prélevé et déposé sur une boîte de Petri stérile placée sur une balance sous la hotte permettant ainsi de le peser, il était ensuite redéposé dans sa boîte d'origine pour continuer son développement. Seule la masse fraîche a été évaluée.

### **4.4 Suspensions cellulaires :**

#### **4.4.1 Milieu de culture :**

Pour la culture des suspensions cellulaires, le milieu est composé de milieu MS + vitamines à 4,4 g/L, de sucrose à 3% (m/v), et d'une balance hormonale ANA/BAP (1,5 mg/L/0,5 mg/L). Le pH a été ajusté à 5,7 avec une solution de NaOH à 1N avant l'autoclavage (20 minutes à 120°C).

#### **4.4.2 Mise en culture et repiquage :**

Le repiquage des suspensions a été fait toutes les deux ou trois semaines en fonction du facteur de dilution utilisé. Concernant les repiquages au ½ toutes les deux semaines, 100 mL de milieu frais ont été ajoutés à la suspension mère (100 mL). 100 mL de cette suspension diluée au ½ était ensuite prélevés et introduits dans un nouvel erlenmeyer stérile pour constituer la suspension fille.

Concernant les repiquages au  $\frac{1}{4}$ , 100 mL de milieu frais ont été ajoutés à la suspension mère (100 mL) et 50 mL de ce milieu frais ont été placés dans 2 ou 3 erlenmeyers stériles. 50 mL de la suspension diluée au  $\frac{1}{2}$  ont été prélevés et ajoutés au 50 mL de milieu déjà présent dans les erlenmeyers. Ainsi les 2 ou 3 suspensions nouvellement formées diluées au  $\frac{1}{4}$  ont été obtenues.

#### **4.4.3 Courbe de croissance :**

La courbe de croissance des suspensions a été réalisée grâce à de la masse sèche et fraîche des suspensions mesurées à 6 jours différents sur une période de 25 jours. Chaque mesure a été réalisée en triplicat. Ceci a donc nécessité 18 erlenmeyers de 50 mL contenant chacun 20 mL de suspension cellulaire diluée au  $\frac{1}{4}$ .

Pour réaliser la courbe de croissance des suspensions une suspension mère est diluée au  $\frac{1}{2}$  en ajoutant 100 mL de milieu. Puis 10 mL de milieu sont placés dans 18 erlenmeyers suivis de 10 mL de la suspension mère diluée au  $\frac{1}{2}$ . Chaque jour de collecte, trois erlenmeyers sont prélevés, leur contenu est centrifugé, le surnageant éliminé puis le culot cellulaire est pesé (ce qui correspond à la masse fraîche). Ces culots sont ensuite congelés (à  $-80^{\circ}\text{C}$ ) puis lyophilisés et enfin pesés pour obtenir la masse sèche de suspensions.

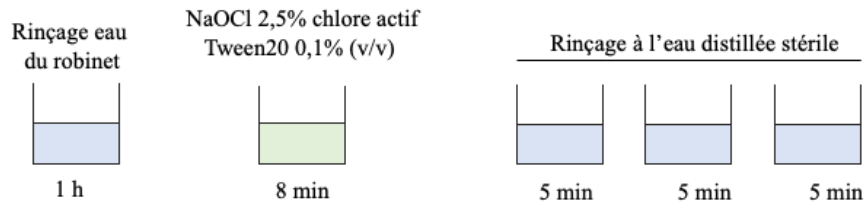
### **4.5 Micropropagation :**

#### **4.5.1 Milieu de culture :**

Pour la micropagation, le milieu solide est composé de milieu MS+ vitamines (Murashige and Skoog 1962) à 4,4 g/L et de sucrose 3% (m/v). Les hormones sont ajoutées en fonction de la balance hormonale souhaitée : IBA (1 mg/L), BAP/KIN (1 mg/mL/0,5 mg/mL). Du PPM (0,1% ; v/v) peut également être ajouté à une concentration de 0,1% (v/v) si besoin. Le pH a ensuite été ajusté à 5,7 avec une solution de NaOH à 1N. De l'agar à 0,8% (m/v) a été ajouté au milieu avant autoclavage (20 minutes à  $120^{\circ}\text{C}$ ). Après l'autoclave, les milieux ont été laissés à refroidir puis 100 mL de milieu ont été prélevés et déposés dans des boîtes magenta stériles. Pour permettre aux milieux de se solidifier, les boîtes Magenta sont laissées ouvertes sous hotte pendant quelques heures, avant d'être stockées à  $4^{\circ}\text{C}$

#### **4.5.2 Protocole de stérilisation :**

Pour la mise en culture des plantules, les explants caulinaires contenant un nœud des plants juvéniles récoltés pour la mise en place de la callogenèse ont été utilisés. Les explants caulinaires ont été stérilisés comme suit.



**Figure VI-10 – Protocole de stérilisation des explants caulinaires des plantules récoltées pour régénérer des plantules d'IGR.**

Les tiges ont été coupées en morceaux d'1 cm de long et placées à la verticale dans le milieu gélosé ne contenant pas d'hormones. Dans chaque boîte Magenta, 3 à 5 explants ont été disposés et 5 boîtes ont été utilisées pour le premier réplicat puis 2 pour les deux suivants.

---

# Chapitre VII

---



## Chapitre VII - Glossaire

---

**Angiospermes** : végétaux qui forment des graines protégées par un fruit clos par opposition aux gymnospermes. Ils sont constitués des monocotylédones (plantes ne possèdent qu'un cotylédon) et les dicotylédones (plantes qui possèdent deux cotylédons).

**Antinociceptifs** : qui inhibent la sensibilité à la douleur

**Apex de la tige** : le sommet d'une tige est appelé l'apex, il s'agit d'une zone de prolifération cellulaire augmentée et de production d'auxines (hormone végétale)

**Boîte Magenta** : Boite carrée de dimensions fixes 76 x 76 x 76 mm en polycarbonate transparent autoclavable avec un couvercle en polypropylène utilisée pour la culture végétale *in vitro*.

**Cellules indifférenciées** : cellules qui ont la capacité de devenir n'importe quelle cellule d'un végétal en fonction des besoins.

### **Cellule végétale** :

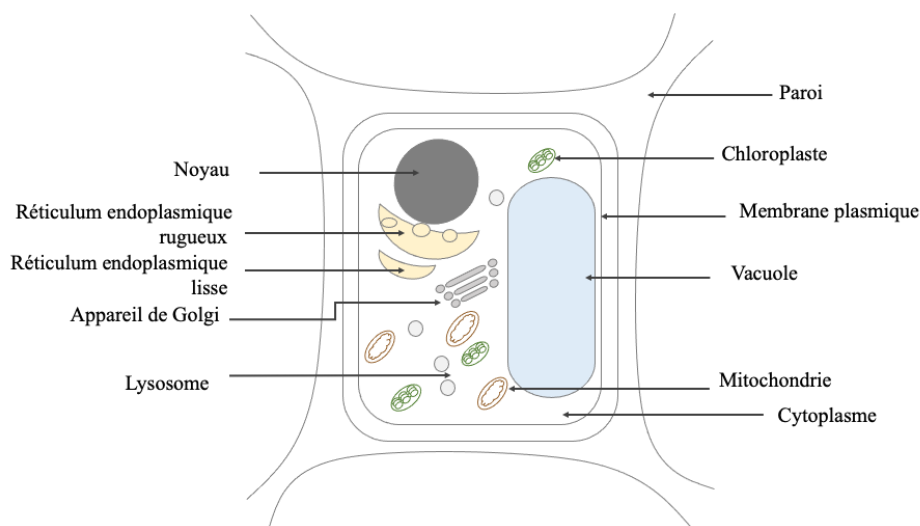


Figure VII-1 – Schéma d'une cellule végétale

**Chloroplaste** : (*voir cellule végétale et plaste*)

**Chlorose** : décoloration des feuilles plus ou moins marquée



**Cytosol** : (*voir cellule végétale*) : Le **cytosol** est un constituant du cytoplasme qui est considéré comme étant le cytosol (partie liquide) et les organites cellulaires.

**Digitée** : une feuille digitée est découpée en forme de main.

**Élution (éluer)** : remise en solution d'un composé adsorbé sur une colonne par exemple

**Entre nœuds** : zone entre les nœuds (points d'attache des feuilles) au niveau de la tige d'un végétal

**Fidélité de mesure ou fidélité (precision en anglais)** : étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées. La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées. Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité (voir l'ISO 5725-1:1994). La fidélité sert à définir la répétabilité de mesure, la fidélité intermédiaire de mesure et la reproductibilité de mesure

**(Condition de) fidélité intermédiaire** (intermediate precision en anglais), f condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier. Les conditions que l'on fait varier peuvent comprendre de nouveaux étalonnages, étalons, opérateurs et systèmes de mesure. En chimie, on utilise quelquefois le terme « condition de fidélité inter-série» pour désigner ce concept.

**Gymnospermes** : plantes dont les graines sont portées par des écailles et non par des fruits fermés. Cet embranchement est constitué presque uniquement des conifères.

**Hypocotyle** : partie de la plante entre les cotylédons et le début de la radicule

**Justesse de mesure**, f justesse, f (measurement trueness en anglais) étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence.

**Kairomones** : Substance, parfois odorante, produite par les individus d'une espèce, qui induit, chez ceux d'une autre espèce, un comportement défavorable à l'espèce émettrice, mais parfois bénéfique à l'espèce réceptrice (Ministère de la culture, 2011)

**Organisation microtubulaire** : dans les cellules végétales se trouvent des structures composées de tubuline impliquées dans la mitose et le transport qui sont les microtubules.

**Peroxisome** : (*voir cellule végétale*) organe végétal qui est impliqué entre autres dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène.

**Pétiolé** : feuille qui possède un pétiolé (**figure VII-2**)

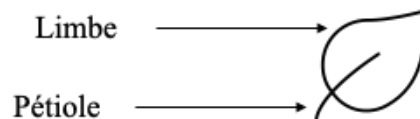


Figure VII-2 – Schéma d'une feuille

**Photosystème** : complexes photosynthétiques localisés dans la membrane des chloroplastes

**Plaste** : Les **plastides** sont des organites propres aux cellules végétales (Buvat et Ledoigt, s. d.). Il y a plusieurs catégories de plaste : chloroplaste dans lesquels se fait la photosynthèse, amyloplaste pour le stockage de l'amidon.

**Plastidiale** : (*voir plaste et cellule végétale*) : la membrane entre le plaste et le cytosol est appelée **membrane plastidiale/barrière plastidique**

**Ptéridophytes** : Plante ayant des vaisseaux et une circulation de sève, mais se reproduisant sans fleurs ni graines, telle que les fougères (Dictionnaire Larousse, s. d.)

**Répétabilité (repeatability)** : répétabilité de mesure, : fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité.

**Sélectivité** : propriété d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, selon laquelle le système fournit des valeurs mesurées pour un ou plusieurs mesurandes, telles

que les valeurs de chaque mesurande sont indépendantes des autres mesurandes ou d'autres grandeurs dans le phénomène, le corps ou la substance en cours d'examen

**Sessiles** : les organismes sessiles sont fixés au substrat

**Trichomes** : les trichomes sont des structures pileuses présentes à la surface des organes végétaux

**Verticillées** : les feuilles verticillées ont une insertion particulière autour de la tige, elles ont par groupe le même point d'insertion au niveau de la tige (**figure VII-3**)



**Figure -VII-3 – Schéma d'une tige avec des feuilles verticillées**

---

# ANNEXES

---



# Annexe 1 : HRAC : Mode of Action Classification

### Light Activation of ROS<sup>a</sup>

**Inhibition of Photosynthesis at PS II**

**5** D1 Serine 264 binders (and other non-histidine 215 binders)

**6** D<sub>1</sub> Histidine 215 binders

### Cellular Metabolism

**2** Inhibition of Acetolactate Synthase

**1** Inhibition of Acetyl CoA Carboxylase

**15** Inhibition of Very Long-Chain Fatty Acid Synthesis

**30** Inhibition of Fatty Acid Thioesterase

**29** Inhibition of Cellulose Synthesis

**31** Inhibition of Serine Threonine Protein Phosphatase

**9** Inhibition of Enolpyruvyl Shikimate Phosphate Synthase

**28** Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase

**18** Inhibition of Dihydroteratoate Synthase

### Cell Division and Growth

**3** Inhibition of Microtubule Assembly

**23** Inhibition of Microtubule Organization

**4** Auxin Mimics

**24** Uncouplers

**19** Auxin Transport Inhibitors

**0** Unknown Mode of Action

HRAC	Legacy HRAC	HRAC	Legacy HRAC
1	A <sub>1</sub>	19	F <sub>1</sub>
2	B	22	D
3	K1	23	K2
4	O	24	M
5	Cl2	27	F2
6	C3	28	none
9	G	29	L
10	H	30	Q
12	F1	31	R
13	F4	32	S
14	E	33	T
15	K3	34	F3
18	I	0	Z

A free copy of this poster can be downloaded at [www.hracglobal.com](http://www.hracglobal.com)

<sup>a</sup> Reactive oxygen species  
<sup>b</sup> Indicates pro-herbicide  
<sup>c</sup> HRAC's recommendation is not to include a chemical family name when there is one active in the family. Actives without chemical family names are indicated with a white background

## Annexe 2 : Liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle, au titre des articles L-253-5 et L.253-7 du code rural et de la pêche maritime

NB. Figurent en gras les produits de référence (noir) et les produits de seconde gamme (bleu). Les produits de revente sont représentés en italique. Les PCP, seconds noms commerciaux, et produits génériques associés à chacun des produits de référence ou de seconde gamme sont alignés sur la droite.  
Les nouveaux produits sont grisés et les retraits sont barrés.

Partie A: Produits phytopharmaceutiques de biocontrôle comprenant des micro-organismes							
Substance active	Nom commercial	N°AMM	Mention EAJ*	Remarque	Production Biologique	CEPP (actualisation 01/01/2022)	Faible risque - Art. 47
<i>Adoxophyes orana</i> GV souche BV-0001	CAPEX	2140187			Oui	2017-004	
<i>Ampelomyces quisqualis</i> strain AQ10	AQ 10	2100207			Oui		
<i>Aureobasidium pullulans</i> souche DSM 14940 et DSM 14941	AUREO SHIELD	2180042		Ancienne dénomination: DECCOFERM	Oui		
<i>Aureobasidium pullulans</i> souche DSM 14940 et DSM 14941	BLOSSOM PROTECT	2110079			Oui		
<i>Aureobasidium pullulans</i> souche DSM 14940 et DSM 14941	BOTECTOR	2120082			Oui	2017-028	
<i>Aureobasidium pullulans</i> souche DSM 14940 et DSM 14941		CINERKIL 2140036			Oui	2017-028	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> souche FZB24	TAEGRO	2180651			Oui	2017-028	Oui
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> souche MBI600	INTEGRAL PRO	2171253			Oui		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> souche MBI600	SERIFEL	2171248			Oui		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> souche D747	AMYLO-X WG	2160841			Oui	2017-028	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> souche D747		DANBACIU 2200892			Oui		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> souche D747	AMYLO-X JARDIN	2190346	X		Oui		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ssp. <i>plantarum</i> souche D747	VALCURE	2210063			Oui		
<i>Bacillus firmus</i> I-1582	FLOCTER	2120069			Oui	2017-027	
<i>Bacillus firmus</i> I-1582	VOTIVO	2190154			Oui		
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	BALLAD	2140160			Oui		
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	SONATA	2180633			Oui	2017-028	
<i>Bacillus subtilis</i> souche IAB/BS03	MILDORÉ	2200311			Oui		Oui
<i>Bacillus subtilis</i> souche IAB/BS03		PORTENTO 2200800			Oui		Oui
<i>Bacillus subtilis</i> souche IAB/BS03		SEITYLUS 2200802			Oui		Oui
<i>Bacillus subtilis</i> souche IAB/BS03		SUBELUS 2200801			Oui		Oui
<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713	HARMONIX TURF DEFENSE	2211033			Oui		
<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713	SERENADE ASO	2180404			Oui	2017-028	
<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713		RHAPSODY 2180404			Oui	2017-028	
<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713	SERENADE BIOFUNGICIDE	2050001			Oui		
<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713	SERENADE MAX	2100162			Oui		
<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713	TEXIO	2180630	X		Oui		
<i>Bacillus subtilis</i> souche QST 713	TEXIO WP	2110040	X		Oui		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	XENTARI	2020241			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> souche GC 91	AGREE 50 WG	2170436			Oui		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351	DIPEL DF	2010513			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		BACIVERS DF 2010513			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		BACTOSPEINE DF 2010513			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		BACTURA DF 2010513			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		SCUTELLO DF 2010513			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		BIOBIT DF 2010513			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		INSECTOBIOL DF 2010513			Oui	2018-034	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351	DIPEL DF JARDIN	2150417	X		Oui		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		BACIVERS DF JARDIN 2150417	X		Oui		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		BACTOSPEINE DF JARDIN 2150417	X		Oui		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		BACTURA DF JARDIN 2150417	X		Oui		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351		SCUTELLO DF JARDIN 2150417	X		Oui		
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> souche ABTS 351	FORAY 48 B	8900137			Oui		

## Annexes

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche EG 2348	LEPINOX PLUS	2160494			Oui	2018-034	
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche EG 2348	RAPAX AS	2200048			Oui		
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche PB 54	TURIBEL	2200701			Oui	2018-034	
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche PB 54		DOCTRIN	2210326		Oui	2018-034	
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 11	DELFIN	9200482			Oui	2018-034	
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 11		DELBACILETI	2160943		Oui		
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 11		WASCO ARBO	2220180		Oui		
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 11		WASCO WG	9200482		Oui	2018-034	
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 11	DELFIN JARDIN	2030175	X		Oui		
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 11		WASCO JARDIN	2030175	X	Oui		
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 12	COSTAR WG	2170466			Oui		
Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki souche SA 12	COSTAR JARDIN	2170465	X		Oui		
Beauveria bassiana souche 147	OSTRINIL	9300093			Oui		
Beauveria bassiana souche ATCC 74040	NATURALIS	2170437			Oui	2021-084	
Beauveria bassiana souche GHA	BOTANIGARD 22 WP	2170780			Oui	2021-084	
Beauveria bassiana souche GHA	BOTANIGARD OD	2200039			Oui		
Beauveria bassiana souche NPP111B005	ARY-0711b-01	2180058			Oui		
Beauveria bassiana souche NPP111B005		SERENISIM	2180058		Oui		
Beauveria bassiana souche PPR15339	VELIFER	2210811			Oui		
Candida oleophila souche O	NEXY	2080108			Oui		
Coniothyrium minitans	CONTANS WG	9900189			Oui	2017-026	Oui
Coniothyrium minitans		FELIZ	2140217		Oui	2017-026	Oui
Cydia pomonella granulosis virus	CARPOVIRUSINE 2000	9800076			Oui	2017-004	
Cydia pomonella granulosis virus	CARPOVIRUSINE GARDEN	2150851	X		Oui		
Cydia pomonella granulosis virus	CARPOVIRUSINE 2000 J	2160620	X		Oui		
Cydia pomonella granulosis virus	CARPOVIRUSINE EVO 2	2120081			Oui	2017-004	
Cydia pomonella granulosis virus		CARPODELIA	2170825		Oui		
Cydia pomonella granulosis virus		KAPUSINE	2170832		Oui		
Cydia pomonella granulosis virus	MADEX PRO	2130175			Oui	2017-004	
Cydia pomonella granulosis virus	MADEX TWIN	2140238			Oui	2017-004	
Clonostachys rosea souche J1446 (anciennement Gliocladium catenulatum souche J1446)	PRESTOP	2120177			Oui	2017-026	
Clonostachys rosea souche J1446 (anciennement Gliocladium catenulatum souche J1446)	PRESTOP 4B	2150847			Oui		
Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus	HELICOVEX	2140094			Oui	2018-046	
Isaria fumosorosea Apopka souche 97	PREFERAL	2010206			Oui	2018-042	Oui
Lecanicillium muscarium souche Ve6	MYCOTAL	2040354			Oui	2018-042	
Metschnikowia fructicola souche NRRL Y-27328	ANTONI	2190671			Oui		
Metschnikowia fructicola souche NRRL Y-27328	LORAN	2190672			Oui		
Metschnikowia fructicola souche NRRL Y-27328	NOLI	2190673			Oui		
Metarhizium anisopliae var. anisopliae BIPESCO 5/F52	LALGUARD M52 GR	2110055			Oui		Ancienne dénomination: MET52 GRANULÉ
Metarhizium anisopliae var. anisopliae BIPESCO 5/F52	MET52 GRANULÉ	2110055			Oui		Nouvelle dénomination: LALGUARD M52 GR
Metarhizium anisopliae var. anisopliae BIPESCO 5/F52		MITAXION G	2110055		Oui		
Paecilomyces fumosoroseus souche Fe9901	FB FE9901 OD	2200569			Oui		
Paecilomyces fumosoroseus souche Fe9901	FUTUREGO NOFLY WP	2200020			Oui		Retrait de la liste au 01/02/2022 - Délai de mise à jour d'étiquette : 31/01/2023
Paecilomyces lilacinus souche 251	BIOACT PRIME	2200197			Oui		
Phlebiopsis gigantea	ROSTOP	2120176			Oui		
Pseudomonas chlororaphis MA342	CERALL	2080056			Oui		
Pseudomonas sp. souche DSMZ 13134	PRORADIX	2170931			Oui		
Pythium oligandrum M1	POLYVERSUM	2150328			Oui	2018-021	
Saccharomyces cerevisiae souche LAS02	JULIETTA	2190010			Oui	2017-028	Oui



Annexes

Saccharomyces cerevisiae souche LAS02		HIVA	2190010			Oui	2017-028	Oui
Saccharomyces cerevisiae souche LAS02	JULIETTA GARDEN		2190011	X		Oui		Oui
Streptomyces K61 (anciennement S. griseoviridis)	MYCOSTOP		2140208			Oui		
Streptomyces K61 (anciennement S. griseoviridis)		LALSTOP K61 WP	2140208			Oui		
Trichoderma asperellum souches ICC012 et Trich. gamsii souche ICC080	BLINDAR		2150155			Oui		
Trichoderma asperellum souches ICC012 et Trich. gamsii souche ICC080		CASSAT WP	2150155			Oui		
Trichoderma asperellum souches ICC012 et Trich. gamsii souche ICC080		ESCALATOR	2180120			Oui		
Trichoderma asperellum souches ICC012 T25 et TV1	XEDAVIR		2130089			Oui		
Trichoderma asperellum T34	T34 Biocontrol		2160492			Oui	2017-026	
Trichoderma asperellum T34		ASPERELLO T34 Biocontrol	2160492			Oui	2017-026	
Trichoderma atroviride I-1237	ESQUIVE WP		2080004			Oui	2021-045	
Trichoderma atroviride I-1237	TRI-SOIL		2160686			Oui	2017-026	
Trichoderma atroviride I-1237	TRI-WALL		2210388			Oui		
Trichoderma atroviride SC1	VINTEC		2169998			Oui	2021-045	Oui
Trichoderma atroviride SC1		TREADANI1	2210474			Oui		Oui
Trichoderma atroviride souche T11 et Trich. asperellum souche T25	TUSAL		2150839			Oui		
Trichoderma harzianum Rifai souches T-22 et ITEM-908	TRIANUM-G		2090168			Oui		
Trichoderma harzianum Rifai souches T-22 et ITEM-908		TRIAGRO GR	2090168			Oui		
Trichoderma harzianum Rifai souches T-22 et ITEM-908	TRIANUM-P		2090169			Oui		
Trichoderma harzianum Rifai souches T-22 et ITEM-908		TRIAGRO WG	2090169			Oui		
Virus de la mosaïque du pépino, isolat VC1 peu virulent / Virus de la mosaïque du pépino, isolat VX1 peu virulent	V10		2190247			Oui		Oui
Virus de la mosaïque du pépino, souche CH2, isolat 1906	PMV-01		2159995			Oui		Oui
Virus de la mosaïque jaune de la courgette souche bénigne	AGROGUARD-Z		2060425		Retrait de l'AMM le 20/01/2022 Produit utilisable jusqu'au 20/01/2023	Oui		
Virus de la polyhedrose nucléaire	LITTOVIR		2160706			Oui	2018-046	

Partie B: Produits phytopharmaceutiques de biocontrôle comprenant des médiateurs chimiques comme les phéromones et les kairomones

Substance active	Nom commercial	N°AMM	Mention EAJ*	Remarque	Production Biologique	CEPP (actualisation 07/07/2021)	Faible risque - Art. 47
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	BIOOTWIN L	2200132			Oui	2020-009	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	BOX T PRO PRESS	2189998			Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CELADA LB 400	2200914		Changement de nom du CLICK LB-PRO le 10/09/2021.	Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CHECKMATE CM-XL	2100036			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)			CARPOF		Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CHECKMATE PUFFER CM-O	2150179			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CHECKMATE PUFFER CM-PRO	2200388			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CHECKMATE PUFFER FRUIT MULTI	2190561			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CHECKMATE PUFFER LB	2160423			Oui	2020-009	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CHECKMATE PUFFER LB/EA	2200389			Oui	2020-009	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CHILOTEC HC	2199993			Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CIDETRAK-CM	2130272			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CIDETRAK-CM MESO	2190599			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CIDETRAK-EGVM	2130273			Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CIDETRAK-OFM	2140143			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CLICK LB	2210793			Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CLICK LB-PRO	2200914		Produit utilisable jusqu'au 30/04/2023	Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CRYPTOTEC	2199996			Oui	2020-009	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	CYDIATEC	2200379			Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ECODIAN CP	2100242			Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ENRAPTA CYDIA BALL	2210541			Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)			CYDIA PRO BALL		Oui	2017-005	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ENRAPTA GRAPHOLITA PRESS	2210610			Oui		

## Annexes

Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		GRAPHOLITA PRO PRESS	2210610				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ENRAPTA LOBESIA PRESS		2220334				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ENRAPTA TUTA PRESS		2220335				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	EXOSEX CM		2110074				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	FERSEX CHS C TM		2060042				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	GRAPHOTEC		2210017				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	GINKO		2000536				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		ISOMATE C TT	2040121				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		POMMUS	2120017				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	GINKO DUO		2110179				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	GINKO RING		2160929				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-A/OFM		2180549				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-C		9900123				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		ISOMATE C PLUS	2040120				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-CLR		2150175				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		ISOMATE TP MAX	2160974				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-CLR MAX		2170785				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-JARDIN		2120033		X		Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-OFM		2100241				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		ISOMATE OFM ROSSO	2120105				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-OFM TT		2120130				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISOMATE-P		2180257				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET 1+2		2130109				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET 2		2130108				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET L		2140043				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET L PLUS		2140044				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET LA PLUS		2161035				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET LE		2120030				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		IMAGO	2120124				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		ISONET DUO	2130064				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET T		2180417				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		ETIONS T	2180891				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET T3		2190594				Oui	2020-071
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ISONET-Z		2170960				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		GINKO Z	2170960				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	LOBESIA ECO AEROSOL		2220044				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	LOBESIA PRO SPRAY		2210439				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		EXPLOYO VIT	2210439				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	LOBETEC		2170435				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		AGRI-LOB	2210757				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		DANICONFUS	2210759				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	MISTER L E		2220002				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	RAK 1 COCHYLIS		9400462				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	RAK 1+2 MIX		2140215				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	RAK 2 NEW		2150105				Oui	2020-009
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	RAK 3 SUPER		2140146				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	RAK 3+4		2170434				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	RAK 5		8900685				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		CONFUSE	2100130				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)		AGRI-GRAPHOLITA	2190353				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	RAK 5+6		2171126				Oui	2017-005
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	SEMIOS LB PLUS AEROSOL		2220045				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	SEMIOS OFM PLUS		2220046				Oui	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	SEMIOSNET CODLING MOTH		2210521				Oui	

## Annexes

Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	TUTATEC	2200133			Oui	2020-071	
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	WEINTEC	2210421			Oui		
Phéromones à chaîne linéaire de lépidoptères (SCLP)	ZEUTEC	2200702			Oui		

Partie C: Produits phytopharmaceutiques de biocontrôle comprenant des substances naturelles d'origine végétale, animale ou minérale							
Substance active	Nom commercial	N°AMM	Mention EAJ*	Remarque	Production Biologique	CEPP (actualisation 07/07/2021)	Faible risque - Art. 47
6-Benzyladenine	EXILIS	2090055				2018-033	
6-Benzyladenine	FUSIO	2090055				2018-033	
6-Benzyladenine	CLAIRCI	2130071				2018-033	
6-Benzyladenine	EXILIS PIMP	2190314					
6-Benzyladenine	MAXCEL	2090019				2018-033	
6-Benzyladenine	CYLEX	2090019				2018-033	
6-Benzyladenine	KLARO	2140155				2018-033	
6-Benzyladenine	MAXOLETI	2160421					
6-Benzyladenine, Gibbérellines GA4/GA7	GIBBALIN	2060079					
6-Benzyladenine, Gibbérellines GA4/GA7	GIBBALIN FORTE	2200148		Ancienne dénomination: GIBBALIN SG			
6-Benzyladenine, Gibbérellines GA4/GA7	PERLAN	9700357					
6-Benzyladenine, Gibbérellines GA4/GA7	PROMALIN	8200489					
ABE-IT-56	BELVINE	2210387		Retrait de la liste au 01/02/2022 - Délai de mise à jour d'étiquette : 31/01/2023			
Acide acétique	CITO FAST	2180244	X				
Acide acétique	CITO MAX	2180245					
Acide acétique	NATUREN EXPRESS	2130153	X				
Acide acétique	SPEED	2130153	X				
Acide acétique	HERBATAK CONTACT	2130153	X				
Acide acétique	DESERBVERT	2170685	X				
Acide acétique	ROUNDUP AC	2170002	X				
Acide acétique	ROUNDUP AC AT	2170003	X				
Acide caprylique	DESHERB'NAT	2180369					
Acide caprylique	NET-HERBE PRO	2180369					
Acide caprylique	NET-HERBE PAE	2180367	X				
Acide gibberellique	BERELEX 40SG	2140001				2017-028	
Acide gibberellique	RYZUP	2140001					
Acide gibberellique	GETRO 40 SG	2190856					
Acide gibberellique	FLORGIB TABLET	2160383					
Acide gibberellique	PROLIANT	2210416					
Acide indolbutyrique	CHRYZOPUS GRIS	8500354					
Acide indolbutyrique	CHRYZOPON ROSE	8500352					
Acide indolbutyrique	CHRYZOTEK BEIGE	8500353					
Acide indolbutyrique	CHRYZOTOP VERT	8500351					
Acide indolbutyrique	CLONEX	2180252	X				
Acide indolbutyrique	RHIZOPON AA POUDRE 0,5%	9200062					
Acide indolbutyrique	RHIZOPON AA POUDRE 1%	9200058					
Acide indolbutyrique	RHIZOPON AA POUDRE 2%	9200056					
Acide pelargonique	BELOUKHA	2140255				2017-020	
Acide pelargonique	KATAMISA	2140255				2017-020	
Acide pelargonique	KALINA	2140255				2017-020	
Acide pelargonique	FOC	2170062				2017-020	
Acide pelargonique	EUDICATCH SEVIGNEA	2180075					
Acide pelargonique	RACABELVIG	2180361					
Acide pelargonique	PELARGO	2190967					
Acide pelargonique	ROCBULVAG	2200515					

## Annexes

Acide pelargonique	BELOUKHA GARDEN	2170243	X				
Acide pelargonique	ALEAVI	2170243	X				
Acide pelargonique	BROMORY	2170243	X				
Acide pelargonique	HERBATAK EXPRESS	2170243	X				
Acide pelargonique	HERBISTOP ULTRA	2170243	X				
Acide pelargonique	KALINA GARDEN	2170243	X				
Acide pelargonique	RADICAL AP	2170243	X				
Acide pelargonique	ROUNDUP PA2	2170243	X				
Acide pelargonique	STARNET	2170243	X				
Acide pelargonique	WEEDOL EXPRESS	2170243	X				
Acide pelargonique	FINALSAN	2110056					2017-020
Acide pelargonique	DEVATOL	2110056					2017-020
Acide pelargonique	FINALSAN AF	2110033	X				
Acide pelargonique	FINALSAN AF PRO	2180614					
Acide pelargonique	FINALSAN POLYVALENT JARDIN	2170355	X				
Acide pelargonique	HARMONIX FOLIAPLUS	2190187					
Acide pelargonique	HERBATAK EASY	2190319	X				
Acide pelargonique	SPEED EASY	2190319	X				
Acide pelargonique	HERBATAK ULTRA	2200526	X				
Acide pelargonique	SPEED ULTRA	2200526	X				
Acide pelargonique	HERBICLEAN CONCENTRE	2210563	X				
Acide pelargonique	HERBICLEAN SPRAY	2200372	X				
Acide pelargonique	HERBISTOP	2140121	X				
Acide pelargonique	NATUR'NET	2140121	X				
Acide pelargonique	STOP'HERBE	2140121	X				
Acide pelargonique	HERBISTOP SPRAY	2160115	X				
Acide pelargonique	STOP'HERBE RTU	2160115	X				
Acide pelargonique	KATOUN	2140254					2017-020
Acide pelargonique	EUDICATCH	2171234					
Acide pelargonique	VEGOLD	2201039					
Acide pelargonique	KATOUN GOLD	2170321					2017-020
Acide pelargonique	KALIPE	2170321					2017-020
Acide pelargonique	REDIALO	2170321					
Acide pelargonique	ROUNDUP ECLAIR	2190513	X				
Acide pelargonique	ROUNDUP ECLAIR AT	2190514	X				
Acides gras	ACARIDOIL 13SL	2210415				Oui	2018-043
Acides gras	FLIPPER	2160527				Oui	2018-043
Acides gras	GRASONORBI	2190357				Oui	
Acides gras	HERBICLEAN ALLEES	2140166	X				
Acides gras	HERBICLEAN JARDIN	2140167	X				
Acides gras	INSECTES ET MALADIES CPJ	2010100	X			Oui	
Acides gras	NEUDOSAN	2210244				Oui	
Acides gras	PUCERONS CPJ	2010099	X			Oui	
Cerevisane	ROMEO	2170654				Oui	2020-007
Cerevisane	ACTILEAF	2171118				Oui	Oui
Cerevisane	CAROMAIT	2200510				Oui	Oui
Cerevisane	CERVITIS	2200142				Oui	Oui
Cerevisane	CEZANE 941 PM	2200399				Oui	Oui
Cerevisane	ROMEO GARDEN	2180275	X			Oui	Oui
COS-OGA	FYTOSAVE	2190730				Oui	2020-007
COS-OGA	ESDEAINE	2190730				Oui	2020-007
COS-OGA	FYTOSAVE GARDEN	2170932	X			Oui	Oui
COS-OGA	MESSAGER	2150479				Oui	2020-007
COS-OGA	BASTID	2150479				Oui	2020-007

Annexes

COS-OGA		BLASON	2150479			Oui	2020-007
COS-OGA		BSTIM	2150479			Oui	2020-007
COS-OGA		MESALIA	2150479			Oui	2020-007
COS-OGA		MESSIDOR	2150479			Oui	2020-007
COS-OGA		MESTAR	2150479			Oui	2020-007
COS-OGA		VACAZOTELI	2170516			Oui	
COS-OGA		GALOPIN+	2171257			Oui	
COS-OGA		PERFORMER SL	2200198			Oui	
Eugenol, Géraniol, Thymol	MEVALONE		2161080			Oui	2017-028
Eugenol, Géraniol, Thymol		NIRKA	2161080			Oui	2017-028
Eugenol, Géraniol, Thymol		YATTO	2161080			Oui	2017-028
Eugenol, Géraniol, Thymol		EUGETI	2170855			Oui	2017-028
Eugenol, Géraniol, Thymol		TRIGEMOL	2170859			Oui	
Eugenol, Géraniol, Thymol		CAGENOLETA	2171177			Oui	
Extrait d'ail	GARLAND		2490200		Retrait de l'AMM le 09/02/2022 Produit utilisable jusqu'au 31/08/2023	Oui	
Extrait d'ail	NEMGUARD GRANULES		2160454			Oui	2017-027
Extrait d'ail		NAMOTELI	2170746			Oui	
Farine de sang	CERTASOL		2110195			Oui	
Géraniol, Thymol	CEDROZ		2200643			Oui	
Gibbérellines GA4/GA7	GIBB PLUS		2030259				
Gibbérellines GA4/GA7		GIBB PLUS 10 SL	2100196				
Gibbérellines GA4/GA7	GIBB FORTE		2200147		Ancienne dénomination: GIBB PLUS SG		
Gibbérellines GA4/GA7	NOVAGIB		9700355				
Gibbérellines GA4/GA7	REGULEX 10 SG		2160390				
Gibbérellines GA4/GA7	STEFAGIB		2010643				
Graisse de mouton	TRICO		2120057			Oui	
Graisse de mouton	TRICO JARDIN		2180289	X		Oui	
Heptamaloxyloglucan	PEL101GV		2070108				
Huile de clous de girofle	BIOKEDA		2110075			Oui	
Huile de colza	NATIVERT		2170978	X		Oui	
Huile de colza	NATIVERT SPRAY		2170977	X		Oui	
Huile de colza	NATUREN ERADIBUG		2110150	X		Oui	
Huile de colza	NATUREN ERADIGUN		2110149	X		Oui	
Huile de menthe verte	BIOX-M		2100194			Oui	2018-035
Huile de menthe verte	BIOX-M AMATEUR		2180858	X		Oui	
Huile de paraffine	ACTIPRON PLUS		9200024			Oui	
Huile de paraffine	ALPHASIS J		2171250	X		Oui	
Huile de paraffine		HIVERSAIN	2171250	X		Oui	
Huile de paraffine		SPASIS	2171250	X		Oui	
Huile de paraffine		STORMING	2171250	X		Oui	
Huile de paraffine	ANTICOCHENILLES NOVA		2140106	X		Oui	
Huile de paraffine	CATANE		9800096			Oui	2020-038
Huile de paraffine		ANTICOCHENILLES BIO MASSO	2150100	X		Oui	
Huile de paraffine		ARB'HIVER JARDIN	2180408	X		Oui	
Huile de paraffine	CATANE JARDIN		2200263	X		Oui	
Huile de paraffine		INSECTICIDE ACARICIDE BIO MASSO	2210843	X		Oui	
Huile de paraffine	CITROLE		9200235			Oui	2020-038
Huile de paraffine	ESTIUOIL		2170462			Oui	2020-038
Huile de paraffine		SUMMER OIL	2170462			Oui	2020-038
Huile de paraffine		CAZOOIL79	2180690			Oui	
Huile de paraffine	FINAVESTAN EMA		8500470			Oui	2020-038
Huile de paraffine	INSECTOIL KEY		2170463			Oui	
Huile de paraffine	LAINCOIL		2170464			Oui	2020-038

## Annexes

Huile de paraffine	OVIPHYT	9300504			Oui	2020-038
Huile de paraffine	ACAKILL	9300504			Oui	2020-038
Huile de paraffine	ALPHASIS EV	9300504			Oui	2020-038
Huile de paraffine	EUPHYTANE GOLD	9300504			Oui	2020-038
Huile de paraffine	L'AVY	9300504			Oui	2020-038
Huile de paraffine	OLIBLAN	9300504			Oui	2020-038
Huile de paraffine	VAZYL-Y	9300504			Oui	2020-038
Huile de paraffine	ACTIPRON EXTRA	2150103			Oui	2020-038
Huile de paraffine	OVIPRON EXTRA	2150104			Oui	2020-038
Huile de paraffine	OVISPRAY	9400496			Oui	2020-038
Huile de paraffine	OVIPRON PLUS	2080010			Oui	
Huile de paraffine	OVIPRON PLUS JARDIN	2160616	X		Oui	
Huile de paraffine	LOVELL	2190065			Oui	2020-038
Huile de paraffine	LUMIERE	2190843			Oui	2020-038
Huile de paraffine	INSECTES D'HIVER	9800396	X		Oui	
Huile de paraffine	POLITHIOL	2160985			Oui	2020-038
Huile de paraffine	OVIPRON SUPER	2160985			Oui	2020-038
Huile de paraffine	OVITHIOL	2160985			Oui	2020-038
Huile de poisson	STOP GIBIER PLUS	2110009			Oui	
Huile de poisson	XPULSE GIBIERS	2160399			Oui	
Huile essentielle d'orange	ARGOS	2200899			Oui	2018-035
Huile essentielle d'orange	ASKOR	2210851			Oui	2018-035
Huile essentielle d'orange	LIMONEN	2210853			Oui	2018-035
Huile essentielle d'orange	LIMOCIDE J	2200059	X		Oui	
Huile essentielle d'orange	LIMOCIDE GARDEN	2200059	X		Oui	
Huile essentielle d'orange	OILIXIR	2200059	X		Oui	
Huile essentielle d'orange	ORANGE	2200059	X		Oui	
Huile essentielle d'orange	OROCIDE	2180631			Oui	
Huile essentielle d'orange	ORO-QUIN	2180631			Oui	
Huile essentielle d'orange	PREVAM	2180631			Oui	
Huile essentielle d'orange	PREVAM PLUS	2180631			Oui	
Huile essentielle d'orange	PREV-AM ULTRA	2180631			Oui	
Huile essentielle d'orange	OROCIDE PLUS	2200324			Oui	
Huile essentielle d'orange	ESSEN'CIEL	2090127		Ancienne dénomination: PREV-AM	Oui	2018-044
Huile essentielle d'orange	AURAN'CIEL	2090127			Oui	2018-044
Huile essentielle d'orange	LIMOCIDE	2090127			Oui	2018-044
Huile essentielle d'orange	LIMOIL	2090127			Oui	2018-044
Huile essentielle d'orange	PREV-AM PLUS	2170412		Retrait de l'AMM le 17/12/2021 Produit utilisable jusqu'au 15/06/2023	Oui	<del>2018-044</del>
Huile essentielle d'orange	CAZNARANJ	2200305		Retrait de l'AMM le 17/12/2021 Produit utilisable jusqu'au 15/06/2023	Oui	
Huile essentielle d'orange	PREV-GARD	2210019	X		Oui	
Huile essentielle d'orange	PREV-GOLD	2190538			Oui	2018-044
Huile essentielle d'orange	PREV-GOLD GARDEN	2210895	X		Oui	
Hydrogénocarbonate de potassium	ANL-F001	2180543			Oui	
Hydrogénocarbonate de potassium	ANL-F001 HG	2180544	X		Oui	
Hydrogénocarbonate de potassium	ANL-F002	2170861	X		Oui	
Hydrogénocarbonate de potassium	ANL-F004	2190264			Oui	
Hydrogénocarbonate de potassium	ARMICARB	2110059			Oui	2017-028
Hydrogénocarbonate de potassium	APC-09CD	2110059			Oui	2017-028
Hydrogénocarbonate de potassium	PONDUCARB	2110059			Oui	
Hydrogénocarbonate de potassium	K-BLOC	2140027			Oui	2017-028
Hydrogénocarbonate de potassium	BICARBENAT 85	2170461			Oui	
Hydrogénocarbonate de potassium	KARBICURE SP	2200366			Oui	

## Annexes

Hydrogénocarbonate de potassium	BICARBI 85	2210334			Oui		
Hydrogénocarbonate de potassium	ARMICARB JARDIN	2110196	X		Oui		
Hydrogénocarbonate de potassium	APC-10CD	2110196	X		Oui		
Hydrogénocarbonate de potassium	ARMICARB JARDIN SPRAY	2171067	X		Oui		
Hydrogénocarbonate de potassium	ECHQUIER	2190265			Oui	2017-028	
Hydrogénocarbonate de potassium	VITISAN	2171200			Oui	2017-028	
Hydrogénocarbonate de potassium	AGRITISAN	2190737			Oui		
Laminarine	IODUS 2 CEREALES	2020021			Oui		
Laminarine	VACCIPLANT GRANDES CULTURES	2020021			Oui		
Laminarine	KOUROS	2020021			Oui		
Laminarine	IODUS 2 CULTURES SPECIALISEES	2080019			Oui	2020-007	
Laminarine	VACCIPLANT FRUITS ET LEGUMES	2080019			Oui	2020-007	
Laminarine	PLANTVAX	2210501			Oui		
Laminarine	VINIVAX	2210501			Oui		
Maltodextrine	ERADICOAT	2160114			Oui	2018-043	
Maltodextrine	BLANMOSCATE	2161072			Oui	2018-043	
Maltodextrine	ERADICOAT MAX	2190191			Oui		
Maltodextrine	MAJESTIK	2190191			Oui		
Mélange de terpénoïdes QRD 460	REQUIEM PRIME	2190196					
Phosphate ferrique	DOFF ANTI-LIMACES ET ESCARGOTS	2200067	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	LIMASOL	2200067	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	DOFF ANTI-LIMACES ET ESCARGOTS PLUS	2200068	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	DOFF ANTI-LIMACES ET ESCARGOTS PRO	2190537			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	IRONCLAD	2190537			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	FERRAMOL	2020003	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	NEU 1165 M	2020003	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	FERRAMOL PRO	2160409			Oui		Oui
Phosphate ferrique	NEU 1166 M PRO	2160409			Oui		Oui
Phosphate ferrique	FERREX	2180147			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	LIMAFER	2180147			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	TURBOPADS	2180147			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	TURBODISQUE	2180147			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	MOLLUSTOP NATURE	2180147			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	CONTRE LIMACE NATURE	2180147			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	LIMADISQUE NATURE	2180147			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	FERREX JARDIN	2180148	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	LIMAFER JARDIN	2180149	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	TURBOPADS JARDIN	2180150	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	TURBODISQUE JARDIN	2180151	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	FERRIMAX	2150969	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	LIMABIOL	2150969	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	IRONMAX PRO	2160226			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	IRONMAX MG	2160226			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	MUSICA	2160226			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	LIM'AGRO	2140252	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	STOP NET LIMACES	2140252	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	NATUREN LIMEX	2150790	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	LIMEX NAPPA	2150790	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	NEU 1186 M	2150789	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	FERRAMOL ULTIMA	2150789	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	FERRAMOL ULTRA	2150789	X		Oui		Oui
Phosphate ferrique	NEUDORFF 1181 M	2110031			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	DAXXOS	2110031			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique	MOLLUX	2110031			Oui	2017-023	Oui

Annexes

Phosphate ferrique	SLUXX HP	2100030			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique		BABOXX 2100030			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique		MINIXX 2100030			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique		SEEDMIXX 2100030			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique		LIMUXX 2190330		Retrait de l'AMM le 31/12/2020 Produit utilisable jusqu'au 30/06/2022	Oui		Oui
Phosphate ferrique	ULTIMUS	2210940			Oui	2017-023	Oui
Phosphate ferrique		BUCCATA 2210940			Oui		Oui
Phosphonate de disodium	CERAXEL	2150074				2020-007	
Phosphonate de disodium		BCP 358 FC 2150074				2020-007	
Phosphonate de disodium	REDELI	2150067				2020-007	
Phosphonate de disodium		SIRIUS 2150067				2020-007	
Phosphonate de disodium		FRUCTIAL 2150067				2020-007	
Phosphonate de disodium		DELIRE+ 2171201					
Phosphonate de disodium		FOSFODIUM 2190567				2020-007	
Phosphonate de disodium		DISODI 2190939				2020-007	
Phosphonates de potassium	ACTICLASTER	2200194					
Phosphonates de potassium	BLAKMUR	2190162					
Phosphonates de potassium		DECCOFITO 2190162					
Phosphonates de potassium	CENTURY	2180598				2020-007	
Phosphonates de potassium		SORIALE 2180598				2020-007	
Phosphonates de potassium		TAFOS 2190572				2020-007	
Phosphonates de potassium	FOSIKA	2190161					
Phosphonates de potassium		MILDFOS 2220003					
Phosphonates de potassium	FBR-A	2190318					
Phosphonates de potassium		FBR-D 2210305					
Phosphonates de potassium		FBR-E 2210306					
Phosphonates de potassium		FBR-F 2210307					
Phosphonates de potassium		FOSHIELD 2200457					
Phosphonates de potassium		URANSER 2201000					
Phosphonates de potassium		ATAPHOS-K 2210265					
Phosphonates de potassium	FBR-B	2190317					
Phosphonates de potassium		DRAP-FHOS 2200796		Ancienne dénomination: DRA-FHOS			
Phosphonates de potassium		ELIXIR 2210246					
Phosphonates de potassium		PHOSFIK 2200831					
Phosphonates de potassium	FBR-C	2190316					
Phosphonates de potassium	LBG-01F34	2100041				2020-007	
Phosphonates de potassium		PERTINAN 2100059				2020-007	
Phosphonates de potassium		ETONAN 2100060				2020-007	
Phosphonates de potassium		MIFOS 2140089				2020-007	
Phosphonates de potassium		CAZFOSFI 2150372					
Phosphonates de potassium		PHOSTIM 730 SL 2160662					
Phosphonates de potassium		SDN-TOP 2170150					
Phosphonates de potassium		EPATAN 2180720				2020-007	
Phosphonates de potassium		ALUCINAN 2200464				2020-007	
Phosphonates de potassium		FACINAN 2200476				2020-007	
Phosphonates de potassium		KUTAIISI 2200512					
Phosphonates de potassium		ALAMODE 2210770					
Phosphonates de potassium		PHOSTIM PRO 2210777					
Phosphonates de potassium	PHYTOSARCAN	2190160				2020-007	
Phosphonates de potassium		BOING 2190160				2020-007	
Phosphonates de potassium		KERALA 2190160				2020-007	
Phosphonates de potassium		TENROK 2190160				2020-007	
Phosphonates de potassium		CAZSOFAI 2190863					



Annexes

Phosphonates de potassium	POST-PHITE	2190159				
Phosphonates de potassium	PYGMALION	2210128				
Phosphonates de potassium	CARPEDIEM	2210128				
Phosphonates de potassium	SAVIAL DIRECT	2190190	X			
Phosphonates de potassium	SAVIAL FORTE	2190158				2020-007
Phosphonates de potassium	CUNEB	2190158				
Phosphonates de potassium	CURANE-EVO	2490158				
Phosphonates de potassium	MIKONOS	2190158				Ancienne dénomination: CURANE EVO
Phosphonates de potassium	MIKONOS EVO	2220267				
Phosphonates de potassium	SAVIAL POST	2190157				
Pyrethrines	POKON-STOP-INSECTES	2400105				Retrait de l'AMM le 15/05/2021 Produit utilisable jusqu'au 12/05/2022
Pyrethrines	QDX INSECTICIDE BIO PLM	2110084	X			
Pyrethrines	QDX INSECTICIDE PLM	2110084	X			
Pyrethrines et Abamectine	FAZIO	2090146	X			
Pyrethrines et Huile de colza	INSECTICIDE SPRUZIT AF	2090200	X			Oui
Pyrethrines et Huile de colza	SOL'INSECT	2090200	X			Oui
Pyrethrines et Huile de colza	INSECTICIDE SPRUZIT EC	2090199	X			Oui
Pyrethrines et Huile de colza	SPRUZIT AF PRO	2160609				Oui
Pyrethrines et Huile de colza	SPRUZIT EC PRO	2160608				Oui
Pyrethrines et Huile de colza	RAPIDINSECT SPRAY	2190808	X			Oui
Pyrethrines et Huile de colza	POLYSECT PLUS SPRAY	2190808	X			Oui
Sable quartzeux	WOBRA	8700752				Oui
Silicate d'aluminium	ARGICAL PRO	2120158				Oui 2018-039
Silicate d'aluminium	ARGI NATURE	2120158				Oui 2018-039
Silicate d'aluminium	ARGI JARDIN	2120173	X			Oui
Silicate d'aluminium	FRUCTIFIA	2120173	X			Oui
Silicate d'aluminium	SOKALCIARBO WP	2100038				Oui 2018-039
Silicate d'aluminium	BAIKAL WP	2100038				Oui 2018-039
Silicate d'aluminium	SURROUND WP CROP PROTECTANT	2060034				Oui 2018-039
Soufre	ACOIDAL WG	2150168				Oui
Soufre	SOFRAL	9200360				Oui
Soufre	ACTIOL	8300063				Oui 2021-008
Soufre	DARTAGNAN	8300063				Oui 2021-008
Soufre	FAETON SC	8300063				Oui 2021-008
Soufre	STARTUP	8300063				Oui 2021-008
Soufre	LUCIFERE	2190198				Oui 2021-008
Soufre	SATELLITE XF	2190198				Oui 2021-008
Soufre	FAETON XF	2190946				Oui
Soufre	DARTAGNAN XF	2190946				Oui
Soufre	STARTUP XF	2190946				Oui
Soufre	LUCIFERE S	2190950				Oui
Soufre	SATELLITE S	2190950				Oui
Soufre	AFEFLOR POWDRE	8000350				Oui 2021-008
Soufre	AFEFLUID VENTILE SUPER	6700395				Oui 2021-008
Soufre	AFESOUFRE VENTILE 98.5	6200445				Oui 2021-008
Soufre	PONROUCH	2040336				Oui
Soufre	MOPFLUID	6200445				Oui
Soufre	AFESUL LIQUIDE 800 SUPER MICRONISE	8300488				Oui 2021-008
Soufre	SOFRAL FLO	2140021				Oui 2021-008
Soufre	ACOIDAL 800 FLO	2170029				Oui 2021-008
Soufre	CUMBIA SC	8300488				Oui
Soufre	SAMBA 800 SUPER CONCENTRE	8300488				Oui 2021-008
Soufre	MAMBO SC	8300488				Oui

## Annexes

Soufre	CEPSUL ESPECIAL 98,5 %		2060007			Oui	2021-008
Soufre		CAZEPSUL	2110034			Oui	
Soufre		SOFLUID DP	2140134			Oui	2021-008
Soufre		SOFLUID DP JARDIN	2160615	X		Oui	
Soufre	COSAVET DF		2130277			Oui	2021-008
Soufre		SOLTRAN DF	2130277			Oui	
Soufre		STIBIN DF	2130277			Oui	
Soufre		SULBARI DF	2130277			Oui	2021-008
Soufre		SULGRAN DF	2130277			Oui	2021-008
Soufre	FLOSUL		2160818			Oui	2021-008
Soufre		AZZURRI	2160818			Oui	2021-008
Soufre		CRETA	2160818			Oui	2021-008
Soufre		MAGNALI	2160818			Oui	2021-008
Soufre		SEFFIKA	2160818			Oui	2021-008
Soufre		STYRAX L	2160818			Oui	2021-008
Soufre		DANISOFRE	2200593			Oui	
Soufre	FLUIDOSOUFRE		5100219			Oui	2021-008
Soufre		FLUID ANCRE 2	5100219			Oui	2021-008
Soufre		FLUIDANCRE 3	5100219			Oui	
Soufre		IDEALFLUID	5100219			Oui	
Soufre	GRAIN D'OR		2090105			Oui	2021-008
Soufre		OROFLUID	2090105			Oui	2021-008
Soufre	HELIOSOUFRE S		9000222			Oui	2021-008
Soufre		BIOSOUFRE	9000222			Oui	2021-008
Soufre		COMBISOUFRE	9000222			Oui	2021-008
Soufre		HELIOTERPEN SOUFRE	9000222			Oui	2021-008
Soufre		MAXISOUFRE	9000222			Oui	2021-008
Soufre		SALTO	9000222			Oui	2021-008
Soufre		SITIA	9000222			Oui	2021-008
Soufre		VERTISOUFRE	9000222			Oui	2021-008
Soufre	JUBILE		2170997			Oui	2021-008
Soufre	KUMULUS DF		9200214			Oui	2021-008
Soufre		AZUPEC WG	2090103			Oui	2021-008
Soufre		QUALISOUFRE	2090103		Ancienne AMM: 2090102, utilisable jusqu'à épuisement des stocks	Oui	
Soufre		SULPEC	2090103			Oui	2021-008
Soufre		KUMUZORLA	2100236			Oui	
Soufre		AZUPEC 80 GD	2160475			Oui	2021-008
Soufre		SULPEC 80 GD	2160475			Oui	2021-008
Soufre		VISUL WG	2190652			Oui	
Soufre		AMODE DF	9200214			Oui	2021-008
Soufre		ATENEA DF	9200214			Oui	2021-008
Soufre		BADISOUFRE M	9200214			Oui	2021-008
Soufre		COVER DF	9200214			Oui	2021-008
Soufre		KUMULAN	9200214			Oui	2021-008
Soufre		SULFOJET DF	9200214			Oui	2021-008
Soufre		SULFOSTAR	9200214			Oui	2021-008
Soufre		TENDER DF	9200214			Oui	2021-008
Soufre		TRILOG	9200214			Oui	2021-008
Soufre		LABELIS EV	2030184	X		Oui	
Soufre	KUMULUS JARDIN		2010410	X		Oui	
Soufre	MALADIES DES ROSIERS CPJ		2010101	X		Oui	
Soufre	MICROTHIOL SPECIAL DISPERS		9800245			Oui	2021-008
Soufre		CITROTHIOL DG	9800245			Oui	2021-008

## Annexes

Soufre		COLLOMIC SP	9800245			Oui	
Soufre		COLPENN DG	9800245			Oui	2021-008
Soufre		PENNTHIOL	9800245			Oui	2021-008
Soufre		SOFRIL GD	9800245			Oui	
Soufre		SOUFREBE DG	9800245			Oui	2021-008
Soufre		SULFOL LS	9800245			Oui	
Soufre		SULFORIX LS	9800245			Oui	2021-008
Soufre		THIOVIT GOLD MICROBILLES	9800245			Oui	2021-008
Soufre	MICROTHIOL SPECIAL JARDIN		9500341		X	Oui	
Soufre		SOUFROR	2060192		X	Oui	
Soufre	MICROTHIOL SPECIAL LIQUIDE		7700216			Oui	2021-008
Soufre		CATZO SC	7700216			Oui	2021-008
Soufre		CITROTHIOL LIQUIDE	7700216			Oui	2021-008
Soufre		CITROTHIOL RAINFREE	7700216			Oui	2021-008
Soufre		MICROSOFRAL SC	7700216			Oui	2021-008
Soufre		PENNTHIOL LIQUIDE	7700216			Oui	2021-008
Soufre		PENNTHIOL RAINFREE	7700216			Oui	2021-008
Soufre		PLANTISOUFRE	7700216			Oui	2021-008
Soufre		SULFORIX RAINFREE	7700216			Oui	2021-008
Soufre		SULTOX FLUIDE LD	7700216			Oui	2021-008
Soufre		THIOPRON RAINFREE	7700216			Oui	2021-008
Soufre		CATZO	2190945			OUI	
Soufre	OIDIOL POWDRAGE		7600310			Oui	2021-008
Soufre		VEGESOUFRE POWDRAGE	7600310			Oui	2021-008
Soufre	POL-SULPHUR 80 WG		2150251			Oui	
Soufre	POL-SULPHUR 80 WP		2150252			Oui	
Soufre	POL-SULPHUR 800 SC		2170538			Oui	
Soufre		VITISOUFRE	2040336			Oui	
Soufre	SOUFRE SUBLIME AFEPASA		2150118			Oui	2021-008
Soufre		FLORFLUID	2150118			Oui	2021-008
Soufre		VENTIFLOR	2150118			Oui	
Soufre		SUBLIMDOR	2190632			Oui	2021-008
Soufre		SUBLIME EXTRA 99%	2160845			Oui	2021-008
Soufre	SOUFRE TRITURE 95%		2120168			Oui	2021-008
Soufre	SOUFRUGEC		6700157			Oui	
Soufre	SULFUR ULTRA		2210939		X	Oui	
Soufre	SULFURMAX		2190874		X	Oui	
Soufre	THIOVIT JET MICROBILLES		2000018			Oui	
Soufre		KOLTHIOR	2000018			Oui	2021-008
Soufre		MICROTHIOL SPECIAL DG	2000018			Oui	2021-008
Soufre		OIDIASE 80	2000018			Oui	2021-008
Soufre		THIOVIT PRO	2000018			Oui	2021-008
Soufre	THIOVIT JARDIN		9500147		X	Oui	
Soufre	VELOURS		2220168			Oui	
Soufre	VISUL GD 80		9700114			Oui	2021-008
Soufre		AZUMO GD	9700114			Oui	
Soufre		SOLFO CER	9700114			Oui	
Soufre		SULPHURYA 80 WG	2220108			Oui	
Soufre	AZUMO JARDIN		2210263		X	Oui	
Soufre	WETTASUL DP		2190027			Oui	
Soufre	WHISPER		2190499			Oui	2021-008
Soufre		AUDITORIUM	2190499			Oui	2021-008
Soufre		KASHMIR	2190499			Oui	2021-008

Annexes

Soufre et Acides gras	RAPID'TOTAL	2190811	X		Oui	
Spinosad	SUCCESS GR	2171089			Oui	2018-037
Spinosad		STORY 2210285			Oui	
Spinosad		MUSDO GR 2171089			Oui	2018-037
Spinosad	SUCCESS SOL	2190760	X		Oui	
Spinosad		INSECT'SOL 2190760	X		Oui	
Spinosad		PROTECT'SOL 2190760	X		Oui	
Spinosad	SYNEIS APPÂT	2060130			Oui	
Spinosad		CAZSUOLIE 2150769			Oui	
Spinosad	TOPGRAIN	2190441			Oui	2020-078
Spinosad		ORGRAIN 2190441			Oui	2020-078
Sulfate de fer	DETRUI-MOUSSE J	2180256	X			
Sulfate de fer	ENGRAIS GAZON ANTIMOUSSE PREMIUM	2180283	X			
Sulfate de fer	ERADIKAMOUSSE F	2130126	X			
Sulfate de fer	ENGRAIS GAZON ANTIMOUSSE F	2130128				
Sulfate de fer	ERADIKAMOUSSE F+	2130125	X			
Sulfate de fer	FLORANID GAZON ANTIMOUSSE	2130127				
Sulfate de fer	ENGRAIS GAZON ANTI-MOUSSE	2201024	X			
Sulfate de fer	RAIDMOUSS	2140190				
Sulfate de fer	RAIDMOUSS JARDIN	2140193	X			
Sulfate de fer	SCOTT'S ANTIMOUSSE	2190066	X			
Terre de diatomée (Kieselgur)	SILICOSEC	2130129			Oui	2020-063

Partie D: Pièges à insectes							
Substance active	Nom commercial	N°AMM	Mention EAJ*	Remarque	Production Biologique	CEPP (actualisation 07/07/2021)	Faible risque - Art. 47
Piège à insectes (Deltaméthrine)	CERATIPACK	2130114					
Piège à insectes (Deltaméthrine)	DECIS TRAP	2130115			Oui	2018-041	
Piège à insectes (Deltaméthrine)		DECIS TRAP MED 2130115			Oui	2018-041	
Piège à insectes (Deltaméthrine)	DECIS TRAP MB	2170392				2018-041	
Piège à insectes (Deltaméthrine)		FLYPACK WALNUT HUSK 2170542					
Piège à insectes (Deltaméthrine)	DECIS TRAP DS	2210477					
Piège à insectes (Deltaméthrine)	DECIS TRAP MC	2190252					
Piège à insectes (Deltaméthrine)	FLYPACK CERASI	2190253					
Piège à insectes (Deltaméthrine)	FLYPACK COMPLETA	2180691					
Piège à insectes (Deltaméthrine)	FLYPACK DACUS	2200509			Oui		
Piège à insectes (Deltaméthrine)	FLYPACK SUZUKII	2210476					
Piège à insectes (Esfenvalérate)	KENOTRAP COMPLET	2210110					
Piège à insectes (Esfenvalérate)		MOSKISAN 2210475					
Piège à insectes (Deltaméthrine)	MAGNET MED	2140091			Oui		
Piège à insectes (Deltaméthrine)	VIO-TRAP	2130112			Oui	2018-041	

\* EAJ : Emploi autorisé dans les jardins



---

# REFERENCES

---



## Références

---

- Abd-Elgawad, A. M., El-Shora, H., El-Shora, H. M. et Abd El-Gawad, A. M. (2015). Physiological and biochemical responses of cucurbita *Pepo* L. Mediated by portulaca *Oleracea* L. Allelopathy. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(1), 386-393.
- Adams, M., Zimmermann, S., Kaiser, M., Brun, R. et Hamburger, M. (2009). A protocol for HPLC-based activity profiling for natural products with activities against tropical parasites. *Natural Product Communications*, 4(10), 1377-1381.
- Ahangar, N., Bakhshi Jouybari, H., Davoodi, A. et Shahani, S. (2021). Phytochemical Screening and Antinociceptive Activity of the Hydroalcoholic Extract of *Potentilla reptans* L. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 7(4), 271-278.
- Al-Snafi, A. E. (2019). Constituents and pharmacology of *Geum urbanum*-A review. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 9(5), 28-33.
- Alarcon, J., Gonzalez, R., Ferrada, D., Campos, J., Finot, V., Werner, E. et Cespedes, C. L. (2014). Germination inhibitory activity of selected plants from Central South of Chile. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(4), 351-358.
- Ali, K. W., Shinwari, M. I. et Khan, S. (2019). Screening of 196 medicinal plant species leaf litter for allelopathic potential. *Pakistan Journal of Botany*, 51(6), 2169-2177.
- Andrews, H. G. et Badyal, J. P. S. (2014). Bioinspired hook surfaces based upon a ubiquitous weed (*Galium aparine*) for dry adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 28(13), 1243-1255.
- Anses. (2022). Note à l'attention des demandeurs d'AMM Cas des produits de biocontrôle. <https://agriculture.gouv.fr/quest-ce-que-le-biocontrole>
- Anžlovar, A. L. et Anžlovar, S. (2019). Allelopathic effect of aqueous extracts of Canadian goldenrod on germination and growth of radish. *Acta biologica Slovenica*, 62, 27-34.
- Appiah, K., Li, Z., Zeng, R.-S., Luo, S., Oikawa, Y. et Fujii, Y. (2015). Determination of allelopathic potentials in plant species in Sino-Japanese floristic region by sandwich method and dish pack method. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(4), 381.
- Atmaca, H., Bozkurt, E., Cittan, M. et Dilek Tepe, H. (2016). Effects of *Galium aparine* extract on the cell viability, cell cycle and cell death in breast cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 186, 305-310.
- Baenas, N., García-Viguera, C. et Moreno, D. A. (2014). Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19(9), 13541-13563.



- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S. et Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233-266.
- Bartsch, A. F. (1954). Practical methods for control of algae and water weeds. *Public health reports*, 69(8), 749-757.
- Batish, D. R., Setia, N., Singh, H. P. et Kohli, R. K. (2004). Phytotoxicity of lemon-scented eucalypt oil and its potential use as a bioherbicide. *Crop Protection*, 23(12), 1209-1214.
- Batsale, M., Bahammou, D., Fouillen, L., Mongrand, S., Joubès, J. et Domergue, F. (2021). Biosynthesis and functions of very-long-chain fatty acids in the responses of plants to abiotic and biotic stresses. *Cells*, 10(6).
- Beyl, C. A. (2004). Getting started with tissue culture: Media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. Dans *Plant Development and Biotechnology* (p. 19-38). CRC Press.
- Bhadoria, P. B. S. (2010). Allelopathy: A Natural Way towards Weed Management. *American Journal of Experimental Agriculture*, 1(1), 7-20.
- Bieberich, J., Lauerer, M., Drachsler, M., Heinrichs, J., Muller, S. et Feldhaar, H. (2018). Species- And developmental stage-specific effects of allelopathy and competition of invasive *Impatiens glandulifera* on cooccurring plants. *PLoS ONE*, 13(11).
- Block, A. K., Yakubova, E. et Widhalm, J. R. (2019). Specialized naphthoquinones present in *Impatiens glandulifera* nectaries inhibit the growth of fungal nectar microbes. *Plant Direct*, 3(5), e00132.
- Böger, P., Matthes, B. et Schmalfuß, J. (2000). Towards the primary target of chloroacetamides - New findings pave the way. *Pest Management Science*, 56(6), 497-508.
- Buvat, R. et Ledoigt, G. (s. d.). *Plaste*. Online. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/plastes/>
- Cai, Z. et Kastell, A. (2013). Enhanced Resveratrol Production in *Vitis vinifera* Cell Suspension Cultures by Heavy Metals Without Loss of Cell Viability Cell suspension culture View project Fresh Cut View project. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 330-340.
- Cambecèdes, J., Largier, G. et Lombard, A. (2012). *Plan national d'actions en faveur des plantes messicoles*. Conservatoire botanique national des Pyrénées et de Midi-Pyrénées – Fédération des Conservatoires botaniques nationaux – Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie. [www.developpement-durable.gouv.fr](http://www.developpement-durable.gouv.fr)
- Campos, J. A., Peco, J. D. et García-Noguero, E. (2019). Antigerminative comparison between naturally occurring naphthoquinones and commercial pesticides. Soil dehydrogenase activity used as bioindicator to test soil toxicity. *Science of The Total Environment*, 694, 1-7.

- Caruntu, S., Ciceu, A., Olah, N. K., Don, I., Hermenean, A. et Cotoraci, C. (2020). *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae): Ethnobotany, Phytochemistry and Biological Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(22), 1-15.
- Carvalho, F. J., de Santana, D. G. et de Araújo, L. B. (2018). Why analyze germination experiments using generalized linear models? *Journal of Seed Science*, 40(3), 281-287.
- Carvalho, M. S. S., Andrade-Vieira, L. F., Santos, F. E. dos, Correa, F. F., das Graças Cardoso, M. et Vilela, L. R. (2019). Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. *Scientia Horticulturae*, 245, 90-98.
- Ceccanti, C., Landi, M., Benvenuti, S., Pardossi, A. et Guidi, L. (2018). Mediterranean Wild Edible Plants: Weeds or “New functional crops”? *Molecules*, 23(9), 1-15.
- Chambre d’Agriculture France. (2022). *Ecophyto*. online. <https://chambres-agriculture.fr/agriculteur-et-politiques/ecophyto/>
- Chittka, L. et Schürkens, S. (2001). Metrology: Successful invasion of a floral market. *Nature*, 411(653).
- Cimmino, A., Mathieu, V., Evidente, M., Ferderin, M., Moreno Y Banuls, L., Masi, M., De Carvalho, A., Kiss, R. et Evidente, A. (2016). Glanduliferins A and B, two new glucosylated steroids from *Impatiens glandulifera*, with in vitro growth inhibitory activity in human cancer cells. *Fitoterapia*, 109, 138-145.
- Comité commun pour les guides en Métrologie. (2012). *Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés* (VIM).
- Compton, M. E. et Koch, J. M. (2001). Influence of plant preservative mixture (PPM)<sup>TM</sup> on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 37(2), 259-261.
- Cunha, S. C. et Oliveira, M. B. P. P. (2006). Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD. *Food Chemistry*, 95(3), 518-524.
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. *Plant hormones* (pp. 1-15). Springer, Dordrecht
- Dayan, F. E. (2019). Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants*, 8(9) 1-18).
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L. et Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- Dayan, F. E., Romagni, J. G. et Duke, S. O. (2000). Investigating the mode of action of natural phytotoxins. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9), 2079-2094

- De Albuquerque, M. B., Dos Santos, R. C., Lima, L. M., Melo Filho, P. D. A., Nogueira, R. J. M. C., Da Câmara, C. A. G. et Ramos, A. D. R. (2011). Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31(2), 379-395.
- De Feo, V., De Martino, L., Quaranta, E. et Pizza, C. (2003). Isolation of phytotoxic compounds from tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1177-1180.
- Délye, C., Jasieniuk, M. et Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, 29(11), 649- 658.
- Dictionnaire Larousse. *Ptéridophytes*. En ligne. Consulté le 29 septembre 2022, <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/pt%C3%A9ridophyte/64908>
- Dimaano, N. G. et Iwakami, S. (2021). Cytochrome P450-mediated herbicide metabolism in plants: current understanding and prospects. *Pest Management Science*, 77(1), 22-32.
- Dornbos, D. L. et Spencer, G. F. (1990). Natural products phytotoxicity A bioassay suitable for small quantities of slightly water-soluble compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 16(2), 339-352.
- Duke, S. O., Dayan, F. E., Romagni, J. G. et Rimando, A. M. (2000). Natural products as sources of herbicides: Current status and future trends. *Weed Research*, 40(1), 99-111.
- Duval, M., Bonassi, J., Hog, J. et Saint-Val, M. (2020). *Liste catégorisée des espèces végétales exotiques envahissantes de la région Grand Est*.
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A. et García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 248(1), 1-18
- European Food Safety Authority, Alvarez, F., Arena, M., Auteri, D., Borroto, J., Brancato, A., Carrasco Cabrera, L., Castoldi, A. F., Chiusolo, A., Colagiorgi, A., Colas, M., Crivellente, F., De Lentdecker, C., Egsmose, M., Fait, G., Gouliarmou, V., Ferilli, F., Greco, L., Ippolito, A., ... Villamar-Bouza, L. (2021). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pelargonic acid (nonanoic acid). *EFSA Journal*, 19(8), 1-64.
- FAO. (2022). FAOSTAT- *Pesticides use*. En ligne, consulté e 29 septembre 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>
- Favaretto, A., Cantrell, C. L., Fronczek, F. R., Duke, S. O., Wedge, D. E., Ali, A. et Scheffer-Basso, S. M. (2019). New Phytotoxic Cassane-like Diterpenoids from *Eragrostis plana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(7), 1973-1981.
- Feinberg, M. (2012). *Labo-stat. Guide de validation des méthodes d'analyse* (Tec et doc).

- Flieller, G., Riffault-Valois, L., Bergaentzlé, M. et Ennahar, S. (2022). Fast and Reproducible 96-Well Plate-Based Method for the Evaluation of the Antigerminative Potential of Plant Extracts and Phytotoxic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- França-Neto, J. de B. et Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: An important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359-366.
- Fujii, Y., Matsuyama, M., Hiradate, S. et Shimosawa, H. (2005). Dish pack method: a new bioassay for volatile allelopathy. *Thymus*, 2(3), 493-497
- Fujii, Yoshiharu, Shibuya, T., Nakatani, K., Itani, T., Hiradate, S. et Parvez, M. M. (2004). Assessment method for allelopathic effect from leaf litter leachates. *Weed Biology and Management*, 4(1), 19-23.
- Giannakopoulos, G., Dittgen, J., Schulte, W., Zoellner, P., Helmke, H., Lagojda, A. et Edwards, R. (2020). Safening activity and metabolism of the safener cyprosulfamide in maize and wheat. *Pest Management Science*, 76(10), 3413-3422.
- Gouvernement français. (2021). *Note de suivi du plan écophyto année 2019-2020*.
- Graymore, M., Stagnitti, F. et Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*, 26(7-8), 483-495.
- Grossmann, K. (2010). Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66(2), 113-120.
- Hall, R. L. et Oser, B. L. (1970). Recent progress in the consideration of flavoring ingredients under the Food Additives Amendment. III. GRAS substances. *Food technology*, 19(2), 1-12.
- Harvey, R. G. et McNevin, G. R. (1990). Combining Cultural Practices and Herbicides to Control Wild-Proso Millet (*Panicum miliaceum*). *Weed Technology*, 4(2), 433-439.
- Heap, I. (2022). *The international Herbicide-Resistant Weed Database*. En ligne, consulté le 29 septembre 2022. [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)
- Herath, H. M. I. et Wijesundara, D. S. A. (2010). Large-scale *in vitro* propagation of *Impatiens repens* Moon., a critically endangered medicinal plant in Sri Lanka. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85(3), 211-214.
- Hódi, A. M., Hódi, L. et Palkovics, L. (2012). Comparative study of the allelopathic effects of invasive wood sorrels (*Oxalis corniculata* L., *Oxalis dillenii* Jacq.) in Hungary, *International Symposium: Current Trends in Plant Protection Proceedings*, 86- 88
- Hong, N. H., Xuan, T. D., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M. et Khanh, T. D. (2003). Screening for allelopathic potential of higher plants from Southeast Asia. *Crop Protection*, 22, 829-836.

- INRAE. (2022). *ephytia*. En ligne. Consulté le 22 septembre 2022. ephytia.inra.fr
- Institut technique de l'agriculture biologique, Ministère de l'agriculture de l'alimentation et de la forêt et Office national de l'eau et des milieux aquatiques. (2013). *Guide pédagogique « Procédures réglementaires applicables aux produits de biocontrôle »*.
- Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S. S., Xu, L., Zhu, J., Zhao, M., Muños, S., Li, Q. X. et Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment International*. 111, 332-351
- Ismail, B. S., Halimshah, S., Juliana, W. W. et Yusoff, N. (2016). Allelopathic Potential of the Leaf and Seed of *Pueraria javanica* Benth. on the Germination and Growth of Three Selected Weed Species. *Sains Malaysiana*, 45(4), 517-521.
- Jun, L., Yonghao, Y., Hongwu, H. et Liyao, D. (2011). Kaempferol-3-O-β-D-glucoside, a potential allelochemical isolated from *Solidago canadensis*. *Allelopathy Journal*, 28, 259-266.
- Jurová, J., Matoušková, M., Wajs-Bonikowska, A., Kalemba, D., Renčo, M., Sedlák, V., Gogaľová, Z., Poráčová, J., Šalamún, P. et Grul'ová, D. (2019). Potential Phytotoxic Effect of Essential Oil of Non-Native Species *Impatiens parviflora* DC. *Plants*, 8, 241.
- Kaab, S. B., Rebey, I. B., Hanafi, M., Hammi, K. M., Smaoui, A., Fauconnier, M. L., De Clerck, C., Jijakli, M. H. et Ksouri, R. (2020). Screening of Tunisian plant extracts for herbicidal activity and formulation of a bioherbicide based on *Cynara cardunculus*. *South African Journal of Botany*, 128, 67-76.
- Kaur, M., Kumar, M., Sachdeva, S. et Puri, S. K. (2018). Aquatic weeds as the next generation feedstock for sustainable bioenergy production. *Bioresource Technology*, 251, 390-402.
- Kaur, S., Singh, H. P., Batish, D. R. et Kohli, R. K. (2011). Chemical characterization and allelopathic potential of volatile oil of *Eucalyptus tereticornis* against *Amaranthus viridis*. *Journal of Plant Interactions*, 6(4), 297-302.
- Keeling, C., Lewis, A. R., Kolotelo, D., Russell, J. H. et Kermode, A. R. (2018). Resin vesicles in conifer seeds: morphology and allelopathic effects. *Canadian Journal of Forest Research*, 48(12), 1515-1525.
- Khuda, F., Iqbal, Z., Khan, A., Nasir, F., Muhammad, N., Ali Khan, J. et Shafiq Khan, M. (2012). Metal analysis, phytotoxic, insecticidal and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa. *Pak. J. Pharm. Sci*, 25(1), 51-58.
- Kocacë Aliskan, I. et Terzi, I. (2001). Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(4), 436-440.

- Kraehmer, H., Laber, B., Rosinger, C. et Schulz, A. (2014). Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: I. Weed Control Research and Safener Technology: The Path to Modern Agriculture. *Plant Physiology*, 166(3), 1119-1131.
- Kwiecińska-Poppe, E., Piotr, K. et Pałys, E. (2011). The influence of water extracts from *Galium aparine* L. and *Matricaria maritima* subsp. *inodora* (L.) dostál on germination of winter rye and triticale. *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura*, 10(2), 75-85.
- Li, W., Khan, M. A., Yamaguchi, S. et Kamiya, Y. (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 46, 45-50.
- Littschwager, J., Lauerer, M., Blagodatskaya, E. et Kuzyakov, Y. (2010). Nitrogen uptake and utilisation as a competition factor between invasive *Duchesnea indica* and native *Fragaria vesca*. *Plant and Soil*, 331(1), 105-114.
- Lobbens, E. S., Breydo, L., Skamris, T., Vestergaard, B., Jäger, A. K., Jorgensen, L., Uversky, V. et van de Weert, M. (2016). Mechanistic study of the inhibitory activity of *Geum urbanum* extract against  $\alpha$ -Synuclein fibrillation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(9), 1160-1169.
- Lobstein, A., Brenne, X., Feist, E., Metz, N., Weniger, B. et Anton, R. (2001). Quantitative determination of naphthoquinones of *Impatiens* species. *Phytochemical Analysis*, 12, 202-205.
- López López, L. I., Nery Flores, S. D., Silva Belmares, S. Y. et Sáenz Galindo, A. (2014). Naphthoquinones: Biological properties and synthesis of lawsone and derivatives — a structured review. *Vitae*, 21(3), 248-258.
- Lorenzo, P., Reboredo-Durán, J., Muñoz, L., González, L., Freitas, H. et Rodríguez-Echeverría, S. (2016). Inconsistency in the detection of phytotoxic effects: A test with *Acacia dealbata* extracts using two different methods. *Phytochemistry Letters*, 15, 190-198.
- Luminita, B., Ion, N. et Mariana, N. (2018). The influence of *Potentilla reptans* extracts on the physiology of *Agropyron repens* L. plants. *Annals of the University of Craiova-Agriculture, Montanology, Cadastre Series*, 48(2), 35-43.
- Ma, C., Sun, Z., Chen, C., Zhang, L. et Zhu, S. (2014). Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. *Food Chemistry*, 145, 784-788.
- Macías, F. A., Castellano, D. et Molinillo, J. M. G. (2000). Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2512-2521.

- McCourt, J. A. et Duggleby, R. G. (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids*, 31(2), 173-210.
- McLafferty, F. W. (1981). Tandem mass spectrometry. *Science*, 214(4518), 280-287.
- Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. (2022). *Note de service DGAL/SDSPV/2022-402*.
- Ministère de la culture. (2011). *kairomone*. En ligne. Consulté le 29 septembre 2022. [http://www.culture.fr/franceterme/terme/COGB8?from=list&francetermeSearchTerme=allomone&francetermeSearchDomaine=0#:~:text=kairomone%2C n.f.&text=Substance%2C parfois odorante%2C produite par,bénéfique à l'espèce réceptrice. \)](http://www.culture.fr/franceterme/terme/COGB8?from=list&francetermeSearchTerme=allomone&francetermeSearchDomaine=0#:~:text=kairomone%2C n.f.&text=Substance%2C parfois odorante%2C produite par,bénéfique à l'espèce réceptrice. ))
- Ministère de la transition écologique et des solidarités. (2018). *Plan écophyto II*.
- Mocan, A., Crişan, G., Vlase, L., Ivanescu, B., Badarau, A. S. et Arsene, A. L. (2016). Phytochemical investigations on four *Galium* species (Rubiaceae) from Romania. *Farmacia*, 64(1), 95-99.
- Mohamed, N., Taha, R. M. et Razak, U. N. A. A. (2019). Micropropagation and Cellular Behaviour Changes During *in vitro* Flowering of *Impatiens balsamina*. *Planta Daninha*, 37, 1-11.
- Mora, F., De Menezes Gonçalves, L., Scapim, C. A., Martins, E. N. et Da Silva Machado, M. D. F. P. (2008). Generalized lineal models for the analysis of binary data from propagation experiments of Brazilian orchids. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(5), 963-970.
- Morikawa, C. I. O., Miyaura, R., de Lourdes Tapia y Figueroa, M., Rengifo Salgado, E. L. et Fujii, Y. (2012). Screening of 170 Peruvian plant species for allelopathic activity by using the Sandwich Method. *Weed Biology and Management*, 12(1), 1-11.
- Müller, K., Tintelnot, S. et Leubner-Metzger, G. (2006). Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: Abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(7), 864-877.
- Mumford, P. M. (1988). Alleviation and induction of dormancy by temperature in *Impatiens glandulifera* Royle. *New Phytologist*, 109(1), 107-110.
- Murphy, B. P. et Tranel, P. J. (2019). Target-site mutations conferring herbicide resistance. *Plants*, 8(10), 382-.
- Mutlu, S. et Atici, Ö. (2009). Allelopathic effect of *Nepeta meyeri* Benth. extracts on seed germination and seedling growth of some crop plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(1), 89-93.

- Naik, P. M. et Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. *Abiotic and biotic stress in plants—recent advances and future perspectives* (Rijeka: In, p. 247-277). InTech.
- Nakka, S., Thompson, C. R. et Jugulam, M. (2017). Target Site-Based and Non-Target Site Based Resistance to ALS Inhibitors in Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science*, 65(6), 681-689.
- Oster, U., Spraul, M. et Rüdiger, W. (1990). Natural inhibitors of germination and growth, v possible allelopathic effects of compounds from *Thuja occidentalis*. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 45(7-8), 835-844.
- Owczarek, A., Gudej, J. et Olszewska, M. A. (2015). Antioxidant activity of *Geum rivale* L. and *Geum Urbanum* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 72(6), 1239-1244.
- Pacanoski, Z. et Saliji, A. (2014). The invasive *Impatiens glandulifera* Royle (Himalayan balsam) in the Republic of Macedonia: First record and forecast. *EPPO Bulletin*, 44(1), 87-93.
- Palacios, S. M., del Corral, S., Carpinella, M. C. et Ruiz, G. (2010). Screening for natural inhibitors of germination and seedling growth in native plants from Central Argentina. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 674-677.
- Pandey, H., Pandey, P., Singh, S., Gupta, R. et Banerjee, S. (2015). Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma*, (252), 647-655.
- Panichayupakaranant, P. (2001). Naphthoquinone formation in cell cultures of *Impatiens balsamina*. *Pharmaceutical Biology*, 39(4), 293-296.
- Parepa, M. et Bossdorf, O. (2016). Testing for allelopathy in invasive plants: it all depends on the substrate! *Biological Invasions*, 18(10), 2975-2982.
- Parlement Européen. (2014). Règlement (UE) no 1143/2014 du parlement européen et du conseil du 22 octobre 2014 relatif à la prévention et à la gestion de l'introduction et de la propagation des espèces exotiques envahissantes. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 2014, L.317/35-L.317-55.
- Parvez, S. S., Parvez, M. M., Fujii, Y. et Gemma, H. (2003). Allelopathic competence of *Tamarindus indica* L. root involved in plant growth regulation. *Plant Growth Regulation*, 41(2), 139-148.
- Patil, J. G., Ahire, M. L., Nitnaware, K. M., Panda, S., Bhatt, V. P., Kishor, P. B. K. et Nikam, T. D. (2013). *In vitro* propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures



- of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2379-2393.
- Piotrowicz-Cieslak, A. I., Adomas, B. et Michalczyk, D. J. (2010). Different glyphosate phytotoxicity of seeds and seedlings of selected plant species. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(1), 123-129.
- Pistelli, L., Giovannini, A., Ruffoni, B., Bertoli, A. et Pistelli, L. (2010). Hairy root cultures for secondary metabolites production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698, 167-184.
- Plant cell technology. (s. d.). PPM directions of use. 2022. <https://www.plantcelltechnology.com/directions-for-use/>
- Pollard, K. M., Varia, S., Seier, M. K. et Ellison, C. A. (2021). Battling the biotypes of balsam: the biological control of *Impatiens glandulifera* using the rust fungus *Puccinia komarovii* var. *glanduliferae* in GB. *Fungal Biology*, 125(8), 637-645.
- Pouvreau, J. B., Gaudin, Z., Auger, B., Lechat, M. M., Gauthier, M., Delavault, P. et Simier, P. (2013). A high-throughput seed germination assay for root parasitic plants. *Plant Methods*, 9, 32.
- Prati, D. et Bossdorf, O. (2004). Allelopathic inhibition of germination by *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 91(2), 285-288.
- Pula, J., Barabasz-Krasny, B., Mozdzen, K., Soltys-Lelek, A. et Lepiarczyk, A. (2016). Effect of aqueous extracts of sticky willy (*Galium aparine* L.) on the growth of seedlings of selected maize varieties (*Zea mays* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(2), 518-524.
- Radhakrishnan, R., Alqarawi, A. A. et Abd Allah, E. F. (2018). Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 131-138.
- Rashidi, S., Reza Yousefi, A., Goicoechea, N., Pouryousef, M., Moradi, P., Vitalini, S. et Iriti, M. (2021). Allelopathic interactions between seeds of *Portulaca oleracea* L. And various crop species. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(8), 3539.
- Raudone, L., Raudonis, R., Gaivelyte, K., Pukalskas, A., Viškelis, P., Venskutonis, P. R. et Janulis, V. (2015). Phytochemical and antioxidant profiles of leaves from different *Sorbus* L. species. *Natural Product Research*, 29(3), 281-285.
- Razavi, S. M., Zahri, S., Zarrini, G., Nazemiyeh, H. et Mohammadi, S. (2009). Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(3), 376-378.

- Ruckli, R., Hesse, K., Glauser, G., Rusterholz, H. P. et Baur, B. (2014). Inhibitory Potential of Naphthoquinones Leached from Leaves and Exuded from Roots of the Invasive Plant *Impatiens glandulifera*. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 371-378.
- Ruszkowski, M. et Forlani, G. (2022). Deciphering the structure of *Arabidopsis thaliana* 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase: An essential step toward the discovery of novel inhibitors to supersede glyphosate. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1494-1505.
- Sakunphueak, A. et Panichayupakaranant, P. (2010). Increased production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Bioresource Technology*, 101(22), 8777-8783.
- Samiei, L., Davoudi Panhekolayi, M., Mirshahi, H. et Karimian, Z. (2018). A simple and efficient micropropagation protocol for New Guinea *Impatiens* (*Impatiens hawkeri*). *Journal of Environmental Biology*, 39(4), 454-458.
- Sasaki, Y. et Nagano, Y. (2004). Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(6), 1175-1184.
- Scavo, A., Pandino, G., Restuccia, A. et Mauromicale, G. (2020). Leaf extracts of cultivated cardoon as potential bioherbicide. *Scientia Horticulturae*, 261, 109024.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S. et Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 1376-1380.
- Schütte, G., Eckerstorfer, M., Rastelli, V., Reichenbecher, W., Restrepo-Vassalli, S., Ruohonen-Lehto, M., Saucy, A. G. W. et Mertens, M. (2017). Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environmental Sciences Europe*, 29(1), 1-12.
- Seralini, G. E. et Jungers, G. (2020). Toxic compounds in herbicides without glyphosate. *Food and Chemical Toxicology*, 146(111770).
- Shahena, S., Rajan, M., Chandran, V. et Mathew, L. (2020). Controlled Release Herbicides and Allelopathy as Sustainable Alternatives in Crop Production. Dans *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture* (p. 237-252). Springer International Publishing.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. et Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012.

- Sikorski, J. A. et Gruys, K. J. (1997). Understanding Glyphosate's Molecular Mode of Action with EPSP Synthase: Evidence Favoring an Allosteric Inhibitor Model. *Accounts of Chemical Research*, 30(1), 2-8.
- Syed, S., Imran Al-Haq, M., Ahmed, Z. I., Razzaq, A. et Akmal, M. (2014). Root exudates and leaf leachates of 19 medicinal plants of Pakistan exhibit allelopathic potential. *Pak. J. Bot*, 46(5), 1693-1701.
- Szewczyk, K. (2018). Phytochemistry of the genus *Impatiens* (Balsaminaceae): A review. *Biochemical Systematics and Ecology*, 80, 94-121.
- Szewczyk, K., Kalemba, D., Komsta, Ł. et Nowak, R. (2016). Comparison of the essential oil composition of selected *Impatiens* species and its antioxidant activities. *Molecules*, 21(9), 1162.
- Szewczyk, K. et Olech, M. (2017). Optimization of extraction method for LC–MS based determination of phenolic acid profiles in different *Impatiens* species. *Phytochemistry Letters*, 20, 322-330.
- Szewczyk, K., Sezai Cicek, S., Zidorn, C. et Granica, S. (2019). Phenolic constituents of the aerial parts of *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae) and their antioxidant activities. *Natural Product Research*, 33, 2851-2855.
- Szewczyk, K., Zidorn, C., Biernasiuk, A., Komsta, Ł. et Granica, S. (2016). Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products*, 86, 262-272.
- Taha, A., Wagiran, A., Ghazali, H., Huyop, F. et Parveez, G. K. A. (2009). *In vitro* regeneration of garden balsam, *Impatiens balsamina* using cotyledons derived from seedlings. *Biotechnology*, 8(1), 44-52.
- Takano, H. K., Ovejero, R. F. L., Belchior, G. G., Maymone, G. P. L. et Dayan, F. E. (2020). ACCase-inhibiting herbicides: Mechanism of action, resistance evolution and stewardship. *Scientia Agricola*, 78(1), 1-11.
- Tatyana Vasilevna, I., Olga Volodymyrivna, G., Erica Leonidivna, T., Irina Aleksandrovna, K. et Alla Mihaylovna, K. (2016). Antimicrobial Activity of the Genus *Galium* L. *Pharmacognosy Communications*, 6(1), 42-47.
- Taylor, K. (1997). *Geum Urbanum* L. *The Journal of Ecology*, 85(5), 705.
- Tela botanica. *Balsamine de l'Himalaya Impatiens glandulifera Royle*. En ligne, consulté le 29 septembre 2022. <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-35713-synthese>
- Thiyagarajan, M. et Venkatachalam, P. (2013). A reproducible and high frequency plant regeneration from mature axillary node explants of *Gymnema sylvestre* (Gurmur)-An

- important antidiabetic endangered medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 50, 517-524.
- Tomovic, M., Bradic, J., Petkovic, A., Bradić, J., Petković, A. et Tomović, M. (2021). Phytochemical and pharmacological properties of some species of the genus *Galium* l. :*Galium verum and mollugo*. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 187-193.
- Tříška, J., Vrchotová, N., Sýkora, J. et Moos, M. (2013). Separation and identification of 1,2,4-trihydroxynaphthalene-1-O-glucoside in *Impatiens glandulifera* royle. *Molecules*, 18(7), 8429-8439.
- Turk, M. A. et Tawaha, A. M. (2003). Allelopathic effect of black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). *Crop Protection*, 22(4), 673-677.
- Uddin, M. N. et Robinson, R. W. (2017). Allelopathy and resource competition: the effects of *Phragmites australis* invasion in plant communities. *Botanical Studies*, 58(1), 1-12.
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R. et Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*, 616, 255-268.
- Verma, N. et Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
- Vieira, M. N., Winterhalter, P. et Jerz, G. (2016). Flavonoids from the flowers of *Impatiens glandulifera* Royle isolated by high performance countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*, 27(2), 116-125.
- Vrchotová, N., Šerá, B. et Krejčová, J. (2011). Allelopathic activity of extracts from *Impatiens* species. *Plant, Soil and Environment*, 57(2), 57-60.
- Wang, J., Qian, J., Yao, L. et Lu, Y. (2011). Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 1-9..
- Wang, S. Q., He, S. ., Zhang, M. ., Zhang, Y. ., Wang, Q. ., Zhang, C. ., Liu, T. ., Liu, B., Han, J. ., Qin, J. . et Sampietro, D. A. (2020). Chemical composition and allelopathic potential of essential oils from *Eupatorium maculatum* on *Lolium perenne* L. and *Echinochloa crusgalli* L. *Allelopathy Journal*, 49(1), 51-62.
- Wang, Y., Slabas, A. R. et Chivasa, S. (2012). Proteomic analysis of dark response in *Arabidopsis* cell suspension cultures. *Journal of Plant Physiology*, 169(17), 1690-1697.

- Weir, T. L., Park, S. W. et Vivanco, J. M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 472-479.
- Xu, A., Zhan, J. C. et Huang, W. D. (2015). Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(1), 197-211.
- Yu, Q., Abdallah, I., Han, H., Owen, M. et Powles, S. (2009). Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, 230, 713-723.
- Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y. et Liu, K. K. (2007, 1 octobre). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(2), 89-96.
- Zhou Y. X., Xin, H. L., Rahman, K., Wang, S. J., Peng, C. et Zhang, H. (2015). *Portulaca oleracea* L.: A review of phytochemistry and pharmacological effects. *BioMed Research International*, 2015.
- Zhu, M., Dong, X., Guo, M., Ferreira, I. et McPhee, D. J. (2015). Phenolic profiling of *Duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules*, 20(12), 22463-22475.
- Zimdahl, R. L. (2018). *Fundamentals of Weed Science: Fifth Edition. Fundamentals of Weed Science: Fifth Edition.*

**Gwenaëlle FLIELLER**  
**Méthodes de caractérisation  
innovantes pour la recherche de  
molécules à potentiel  
allélopathique**

L'utilisation massive de produits phytosanitaires pour la protection des cultures est un problème majeur à cause de leur toxicité environnementale et sur les espèces non-ciblées. L'objectif de cette thèse a été de développer une méthode innovante en plaque 96 puits permettant d'évaluer l'activité phytotoxique d'extrait de plantes ou de molécules pures rapidement ainsi qu'un couplage séparation chromatographique – test antigerminatif. L'activité d'une dizaine de plantes adventices, ornementales vigoureuses ou invasives a été évaluée dont celle de la balsamine de l'Himalaya (différents organes et suspensions cellulaires). Les extraits de feuilles de cette dernière ont montré une forte activité phytotoxique sur les graines de cresson qui semble due à la présence de naphthoquinones.

Mots clés : *Impatiens glandulifera* Royle, phytotoxicité, bioherbicides, développement de méthode, plantes adventices, culture *in vitro*.

**Innovative characterization method for the research of  
molecules with an allelopathic potential**

The massive use of crop protection products is a major problem due to their toxicity on the environment and on non-target species. The aim of this project was to develop an innovative method in 96 well plate allowing the evaluation of the phytotoxic activity of plant extracts or pure molecules to accelerate the discovery of plant phytotoxic compounds. This test was coupled with an HPLC separation for the first time. The activity of ten weed or invasive plants was evaluated including the one of the Himalayan balsam. The extracts of the leaves showed a strong activity against the germination of cress seeds which could be due to the presence of naphthoquinones.

Key words : *Impatiens glandulifera* Royle, phytotoxicity, biohercides, method development, *in vitro* culture.