



Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie  
Département D'agronomie

# THESE

De Doctorat En Sciences

Filière : Sciences agronomiques

Option : Biotechnologie végétale

*Présentée par*

Mme BENOURAD Fouzia

Sous le thème

---

## **Etude des pouvoirs antimicrobiens et pharmacologiques des extraits de *Thymus vulgaris* L. et l'induction de la défense chez la tomate vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, et *Phytophthora parasitica*.**

---

*Composition de jury de soutenance :*

<i>Noms et Prénoms</i>	<i>Grade</i>	<i>Qualité</i>	<i>Appartenance</i>
<b>Abdellah BERKANI</b>	Pr	Président	Université de Mostaganem
<b>Lakhdar BELABID</b>	Pr	Examineur	Université de Mascara
<b>Miloud BELAHCENE</b>	Pr	Examineur	Centre univ. d'AinTémouchent
<b>Kadour BOUDEROUA</b>	Pr	Examineur	Université de Mostaganem
<b>Jean-Marie COLET</b>	Pr	Examineur	Université de Mons de Belgique
<b>Mokhtar YUCEF-BENKADA</b>	Pr	Directeur de thèse	Université de Mostaganem

---

Année universitaire 2014-2015

*A l'âme de ma défunte mère,  
Repose en paix ton souhait s'est accompli*

*A mon très cher père, Leur fierté à mon égard aujourd'hui est  
pour moi la meilleure des récompenses. Que dieu le protège, inshallah*

## Remerciements

Je remercie le professeur Youcef Benkada Mokhtar mon directeur de thèse, pour avoir dirigé mes travaux de recherche. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour ses conseils judicieux. J'aimerais lui adresser mes plus vifs remerciements pour son dynamisme, son soutien, ses conseils et sa confiance qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour ces années de travail sous sa direction.

Je suis très honorée par la présence de professeur Berkani Abdellah ; professeur et doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie, qui a bien voulu présider ce jury.

Mes remerciements s'adressent aux membres de Jury ; Professeur Boudaroua Kaddour, professeur Belabid Lakhdar et Professeur Belahcen Miloud. Je suis très sensible à l'honneur qu'ils me font d'accorder une partie de leur temps afin de juger ce travail. Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

Je remercie également Monsieur Jean-Marie Colet, Professeur au service de biologie humaine et toxicologie de l'université de Mons (Belgique), d'avoir accepté de m'accueillir au sein de son service pour mettre à jour une bonne partie de ce travail. Je le remercie vivement pour sa précieuse collaboration j'ai eu le privilège de bénéficier de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.

Je n'oublierai jamais l'aide précieuse de Mme Virginie, zehra, Manuel et toute l'équipe de toxicologie de l'université de Mons.

Je remercie également Monsieur Michel Ponchet, Professeur à INRA sophia-antipolis France, pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein du laboratoire, pour m'avoir encouragée et permis de discuter à de nombreuses reprises de ce travail. Merci pour leur efficacité et leur motivation. Merci pour leurs qualités humaines, leur bonne humeur et leur soutien.

Toute ma reconnaissance et ma gratitude à Mr.Mokhbi Abdelwahab d'avoir eu l'amabilité de lire ce travail.

Je n'oublierais pas de remercier mes amies Belkacemi Louiza, Saiah Farida, Boualem Malika, et Badaoui Ikram.

Bien sûr, je ne peux terminer sans remercier encore une fois mes proches du fond de mon coeur et notamment mes parents pour leur soutien inconditionnel dans toutes les étapes de ma vie, merci de m'avoir toujours laissée faire mes choix et les assumer.

Un grand merci a tous les membres de ma famille.

BENOURAD Fouzia

## Résumé

Le présent travail a pour objectif l'étude de l'efficacité des extraits de *Tymus vulgaris* L. une plante médicinale et aromatique indigène dans la lutte contre certaines maladies des plantes et des pouvoirs inducteurs de la défense naturelle. Les essais *in vitro* par contact direct avec les isolats étudiés montrent une inhibition totale de la croissance mycélienne et de la sporulation. *In vivo* par traitement préventif sur semences et plantules de tomates réalisés par application des extraits de thym sur quelques isolats responsables de maladies cryptogamiques foliaires et telluriques, les résultats montrent un pouvoir antifongique très important, aucune des maladies n'est observée sur les deux pathosystèmes étudiés ; *FOL/Solanum lycopersici* et *Botrytis cinerea/Solanum lycopersici*. Le pouvoir éliciteur de l'extrait hydroalcoolique est prospecté par l'analyse de l'expression des gènes par la RT-qPCR, le profil protéinique et phénolique des extraits de plants de tomates traitées. Les résultats de ces expériences montrent clairement, l'induction de l'expression du gène codant pour la protéine PR1P6 pour plus de 200 fois et le gène codant pour la chitinase4 pour 50 fois de plus. Cependant, pour la synthèse des PR-protéines, en comparant avec le témoin aucune différence n'est observée sur SDS-PAGE. Néanmoins, l'induction de la synthèse de la protéine PR1P6 est accomplie, ceci a été révélé par le western blot. En parallèle l'analyse HPLC-DAD montre qu'il s'agit du thym à chémotype thymol, et que son extrait est très riche en flavonoïdes libres et glycosylés. De plus, le résultat dévoile la présence de l'acide salicylique connu comme signal dans la SAR et comme inducteur des gènes de défense. D'après ces résultats, nous pouvons confirmer l'efficacité des extraits de thym comme un biopesticide d'origine botanique, la richesse des extraits naturels en molécules bioactives et la présence de l'AS parmi les constituants des extraits de thym lui confère une importante efficacité par contact direct et dans l'induction de la défense chez les plantes.

D'autre part, l'évaluation prospective de la toxicité potentielle des doses répétées des extraits de thym, est étudié chez les rats wistar au moyen de la chimie clinique, l'histopathologie et via une approche métabonomique basée sur la spectrométrie H-RMN. Sur le plan histopathologique, aucun signe d'anomalie ou de dégénérescence n'est observé chez les rats traités. En revanche, l'analyse métabonomique a révélé des altérations de quelques métabolites impliqués dans le métabolisme énergétique des mitochondries hépatocytaires. Cependant, l'importance des effets indésirables générés après injection à doses répétées de l'huile essentielle de thym est beaucoup plus faible par rapport aux traitements appliqués par l'extrait polyphénolique.

**Mots clé :** thym, huile essentielle, extrait, biofongicide, élicitation, toxicité.

## Abstract

The present work aims to study the effectiveness of *Thymus vulgaris* extract; a native medicinal and aromatic plant to the fight diseases of plants and inducing natural defense powers. The *in vitro* studied by direct contact with isolates showed total inhibition of mycelial growth and sporulation. *In vivo*, preventive treatment on seed and seedlings of tomato are made by applying thyme extracts an few isolates responsible for foliar and soil-borne fungal disease, the results show a very significant antifungal potency, no disease observed in studied pathtests *FOL/Solanum lycopersici* and *Botrytis cinerea/Solanum lycopersici*. The elicitor power of the hydroalcoholic extract is explored through the analysis of gene expression by qRT-PCR, the protein extracts and phenolic profile of tomato plants treated. The results of these experiments show clearly, induction of expression of the gene encoding the protein PR1P6 for more than 200 times and the gene encoding chitinase4 for more than 50 again. However, the synthesis of PR- proteins, no difference is observed on SDS-PAGE comparing with the control. However, the induction of the synthesis of PR1P6 protein is accomplished, is what was revealed by Western blot. In parallel, the HPLC-DAD analysis shows that this is the thyme of thymol chemotype, and its extract is rich an free and glycosylated flavonoids. Moreover, the result reveals the presence of salicylic acid known in the SAR signal and as an inducer of defense genes. Based on these results, we can confirm the effectiveness of extracts of thyme as a biopesticide with botanical origin, wealth of natural extracts with bioactive molecules and the presence of AS among the constituents of extracts of thyme entrusted the significant efficiency by direct contact and in the induction of plant defense.

On the other hand, prospective evaluation of the potential toxicity of repeated doses of extracts of thyme, is studied in Wistar rats by means of clinical chemistry, histopathology and via a metabonomics approach based on <sup>1</sup>H-NMR spectrometry. Histopathologically, no sign of abnormality or degeneration was observed in treated rats. As against the metabonomics analysis showed alterations of some metabolites involved in the energy metabolism of the mitochondria of hepatocytes. However, the magnitude of adverse effects generated after injection of repeated doses of the essential oil of thyme is much lower compared to treatments applied by the polyphenolic extract.

**Keywords:** thyme, essential oil, extracts, biofungicide, elicitation, toxicity.

## ملخص

يهدف هذا العمل إلى دراسة فعالية مستخلصات الزعر الثناع؛نبته طبية وعطرية محلية في مكافحة بعض الأمراض النباتية و تحفيز القوى الدفاع الطبيعية. في المختبر أظهرت التجارب عن طريق الاتصال المباشر مع العزلات تثبيط النمو الكامل للفطريات و التبوغ. في الجسم الحي العلاج الوقائي على بذور و شتلات الطماطم عن طريق رش مستخلصات الزعر على الفطريات المعزولة المسؤولة عن الأمراض الورقية و التي تنتقل عبر التربة ، تظهر النتائج وجود قوة كبيرة جدا مضاد للفطريات المدروسة ، ويلاحظ عدم ظهور المرض في كل من الاختبارات طماطم/ فزاريوم و طماطم/ التخمر الرمادي. كما درست امكانية تحفيز المقاومة الطبيعية بواسطة تقنية التعبير الجيني عن طريق qRT-PCR ، و دراسة مستخلصات البروتينات و المواد الفينولية من نباتات الطماطم المعالجة. نتائج هذه التجارب تظهر بوضوح ، تحريض التعبير عن الجينات التي تشفر بروتين PR1P6 لأكثر من 200 مرة و الجين chitinase4 50 مرة. ومع ذلك ، إنتاج البروتينات المصنعة في الحالات المرضية (-PR) مقارنة مع الشاهد، لم يلاحظ أي فرق على هلام SDS-PAGE. غير أنه تم تصنيع البروتين PR1P6، هو ما كشفت عنه نتائج Western blot. في الموازة ذلك، يظهر تحليل HPLC-DAD أن هذا الزعر من النوع الكيميائي ثيمول ، و أن المستخلص الفينولي غني بالفلافونويد الحرة و المركبة بالسكريات. و علاوة على ذلك ، فإن النتائج تكشف عن وجود حمض الصفصاف Acide Salicylique المعروف في إشارة SAR و باعتباره محفز لجينات الدفاع الطبيعي عند النباتات. بناء على هذه النتائج، يمكننا التأكد من فعالية مستخلصات الزعر باعتباره من المبيدات الحيوية النباتية ، غنى المستخلصات الطبيعية بالجزيئات النشطة بيولوجيا و وجود AS بين مكونات مستخلصات من الزعر يعطيه كفاءة مضادة للفطريات كبيرة من خلال الاتصال المباشر و تحريض الدفاع الطبيعي عند النباتات.

من ناحية أخرى ، تقييم السمية المحتملة لجرعات متكررة من مستخلصات الزعر على فئران ويستار عن طريق الكيمياء السريرية ، علم أمراض الأنسجة ودراسة الاستقلاب عن طريق قياس الطيف استنادا إلى دراسة H NMR، لم يلاحظ أي علامة غير طبيعية أو الضمور في أنسجة الفئران المعالجة. في المقابل تحليل الاستقلاب (metabonomics) أظهرت عرقلة لبعض نواتج الأيض المشاركة في استقلاب الطاقة في ميتوكوندريا خلايا الكبد. ومع ذلك ، ضخامة الآثار السلبية بعد حقن الجرعات المتكررة من الزيت العطري من الزعر هو أقل بكثير مقارنة مع العلاجات بالمستخلص البوليفينولي للزعر.

الكلمات الرئيسية : الزعر ، الزيت العطري، استخلاص، مبيد فطري طبيعي، سمية.

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>page</b>
<b>RESUME</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
ملخص	
<b>LISTE DE TABLEAUX</b>	
<b>LISTE DE FIGURES</b>	
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	01

## Partie I : partie Bibliographique

### CHAPITRE I : *le Thym commun.*

I.1. Generalites .....	03
I.2. Origine et repartitions géographique.....	03
I.3. Classe systematique.....	04
I.4. Description botanique.....	04
I.5. Composition chimique.....	06
I.6. Activites biologiques .....	08
I.6.1. Effets antioxydants.....	08
I.6.2. Effets antimicrobiens.....	08
I.6.3. Effets insecticide.....	09
I.7. Effets secondaires et toxicite .....	10

### CHAPITRE II : Induction de la défense

II.1 Generalites .....	11
II.2. Metabolites secondaires impliqués dans la defense naturelle.....	11
Ii.2.1. PRprotéines et phtoalexines.....	11
II.2.2. Composés phénoliques et renforcement parentéral .....	14

II.3.	Eliciteurs et induction de la résistance .....	14
II.3.1.	Phytohormones impliqués dans la résistance .....	16
ii.3.1.1.	<i>La voie de l'acide jasmonique</i> .....	16
ii.3.1.2.	<i>Voie de l'acide salicylique</i> .....	17
ii.3.1.3.	<i>Voie de l'éthylène</i> .....	19
II.3.2.	La synchronisation des voies de signalisation .....	19
II.4.	Induction de la défense chez la tomate .....	20
II.4.1.	La défense chez la tomate .....	20
II.4.1.1.	<i>Pathogenesis-related proteins chez la tomate</i> .....	22
II.4.1.2.	<i>Elicitation et voies de signalisation chez la tomate</i> .....	24

## Partie II : partie Expérimentale

### CHAPITRE I: Efficacité des extraits de thym

I.1.	Objectif .....	26
I.2.	Matériel végétal .....	26
I.3.	Procédés des extractions.....	27
I.3.1.	Extraction soxhlet.....	27
I.3.2.	Extraction par hydrodistillation .....	28
I.4.	Matériel fongique .....	29
I.4.1.	Isollements.....	30
I.5.	Préparation du milieu de culture .....	30
I.6.	Action <i>in vitro</i> des extraits sur les agents phytopathogènes.....	31
I.6.1.	Action sur la croissance mycélienne .....	31
I.6.2.	Action sur la sporulation .....	31
I.6.3.	Action direct sur des zoospores .....	32

	<i>I.6.3.1 .Préparation des zoospores</i> .....	32
	<i>I.6.3.2. Conduite de l'essai</i> .....	32
I.7.	Action <i>in vivo</i> des extraits sur les agents phytopathogènes .....	32
	I.7.1 La phytotoxicite des extraits .....	32
	I.7.2. Evaluation de l'efficacite biofongicide.....	33
	<i>I.7.2.1. Traitement sur feuilles détachées</i> .....	33
	<i>I.7.2.2. Traitement préventif sur semences</i> .....	33
	<i>I.7.2.3. Traitement préventive sur plantules</i> .....	34
	<i>I.7.2.3.1. Inoculation de l'agent phytopathogène</i> .....	34
I.8.	Rèultats.....	35
	I.8.1. Rendements d'extractions.....	35
	I.8.2. Identification des isolats .....	36
	I.8.3. Efficacité biofongicide par contact direct.....	38
	I.8.3.1. <i>Effet de l'huile essentielle sur la croissance mycélienne et la sporulation</i> .....	38
	I.8.3.2. <i>Effet de l'extrait polyphénolique sur la croissance mycélienne et la sporulation</i> .....	41
	I.8.3.3. Action directe sur des zoospores.....	42
I.9.	Phytotoxicite des extraits.....	43
I.10.	Efficacite biofongicide <i>in vivo</i> .....	43
	<i>I.10.1. Effets sur feuilles détachées</i> .....	43
	I.10.2.Pathosystème Tomate/ FOL .....	44
	I.10.2.1. traitement des plantules.....	44
	I.10.2.2. traitement des semences.....	45
	I.10.3.Pathosystème tomate/pouriture grise.....	46
	I.10.3.1. traitement des plantules.....	46

I.10.3.2. traitement des semences.....	46
I.11. Discussion .....	48
I.11.1. Efficacité antifongique <i>in vitro</i> .....	48
I.11.2. Tests de phytotoxicité .....	49
I.11.3. Efficacité biofongicide <i>in vivo</i> .....	50

## **CHAPITRE II : Etude sur l'éventuel pouvoir Eliciteur de la défense naturelle.**

II.1. Objectif .....	52
II.2. Matériel et methodes.....	52
II.2.1. Matériel végétal.....	52
II.2.2. Détermination de la composition chimique.....	53
II.2.2.1. <i>Test préliminaire</i> .....	53
II.2.2.2. <i>Test de confirmation</i> .....	54
II.2.3. Traitements des plants de tomates .....	54
II.2.4. Etude de l'élicitation de quelques gènes impliqués dans la défense .....	55
II.2.4.1. <i>Extraction de l'ARN</i> .....	55
II.2.4.2. <i>La Rétrotranscription de l'échantillon d'ART</i> .....	55
II.2.4.3. <i>PCR en temps réel</i> .....	56
II.2.5. Extraction des métabolites secondaires .....	57
II.2.5.1. <i>Extraction des protéines</i> .....	57
II.2.5.2. <i>Extraction des composés phénoliques</i> .....	58
II.3. Résultats .....	59
II.3.1. Identification de quelques constituants de l'extrait.....	59
II.3.2. Gènes de défense induits par le traitement appliqué.....	61
II.3.2.1. <i>Expression des gènes de défense</i> .....	61
II.3.3. Synthèse des protéines de défense .....	62

II.3.4.	Western blot.....	63
II.3.5.	Extraits phénoliques des feuilles de tomate .....	64
II.4.	Discussion.....	65
II.4.1.	Surexpression de gènes de défense et production des PR-Protéines .....	65
II.4.2.	Production des métabolites secondaires de nature phénolique.....	66
II.4.3.	composition de l'extrait de thym et l'induction de la défense.....	67

### **CHAPITRE III : Evaluation prospective de la toxicité potentielle de doses répétées des extraits de *Thymus vulgaris* L.**

III.1	Objectif.....	69
II.2.	Matériel et méthodes.....	70
III.2.1.	Animaux .....	70
III.2.2.	Conduite de l'essai.....	71
III.2.3.	Chimie clinique.....	71
III.2.4.	Histopathologie.....	71
III.2.5.	Etude métabonomique.....	72
III.2.5.1.	<i>Spectroscopie 1HRMN de l'urine</i> .....	72
III.2.5.2.	<i>Réduction des données et l'analyse en composantes principales</i> .....	72
III.3	Statistiques.....	73
III.4	Résultats.....	73
III.4.1.	Signes physiques et comportement des rats.....	73
III.4.2.	Effets des extraits sur les consommations d'eau, de nourriture et du poids corporel.....	73
III.4.3.	Résultats histopathologiques.....	74
III.4.4.	Effets des extraits sur les paramètres hépatiques et rénaux.....	75

III.4.5. Effets des extraits sur profils métabonomiques de l'urine.....	76
IV.4.5.1. <i>PCA de données 1H RMN</i> .....	76
IV.4.5.2. <i>Spectres 1H-RMN de l'urine</i> .....	79
III.5 Discussion .....	81
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	84
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>ANNEXES</b>	

## Liste des figures

	P.
Figure 1: Aspects morphologiques de <i>Thymus vulgaris</i> L.	05
Figure 2 : Trichomes glandulaires sur le côté adaxial (en haut) et abaxial (en bas) d'une feuille de thym, composés des cellules sécrétoires et d'une cavité de stockage.	05
Figure 3: Structures chimiques de quelques constituants des huiles essentielles	07
Figure 4: Exemples de phytoalexines chez quelques plantes	13
Figure 5 : induction des voies de défense chez les	15
Figure 06: La voie des jasmonates (biosynthèse et modification de l'acide jasmonique)	17
Figure 07: Voie de biosynthèse de l'acide salicylique chez <i>A.thaliana</i> .	18
Figure 08: Structure chimique de la systemine	24
Figure 09: Echantillon de thym constitué principalement des parties florales	26
figure 10 : Zone de prélèvement des échantillons de thym	27
Figure 11: Dispositif d'extraction Soxhlet et d'évaporation du solvant extractant	28
Figure 12: Dispositif d'extraction par hydrodistillation	29
Figure 13 : Huile essentielle de thym récupérée par hydrodistillation.	35
Figure 14: Extrait polyphénolique récupéré par extraction Soxhlet	35
Figure 15: Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats ; (Is01 : <i>FOL</i> , Is02 : <i>Alternaria</i> sp., Is03 : <i>Phytophthora infestans</i> ).	37
Figure 16A: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet de différentes concentrations en l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .	38
Figure 16B: Taux d'inhibition de la sporulation sous l'effet de différentes concentrations en l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> .	39
Figure 17: inhibition totale de la croissance mycelienne de l'isolat <i>Phytophthora infestans</i> à HE01 de thym.	40
Figure 18: Inhibition totale de la croissance mycélienne de l'isolat <i>Botrytis cinerea</i> à HE01 de thym.	40
Figure 19A: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet de différentes concentrations en extrait polyphénolique de <i>Thymus vulgaris</i> .	41
Figure 19B: Taux d'inhibition de la sporulation sous l'effet de différentes concentrations en extrait polyphénolique de <i>Thymus vulgaris</i>	42
Figure 20: Résultats de traitement préventif appliqué par pulvérisation 48heures post inoculation par <i>Phytophthora parasitica</i> 721.	44

Figure 21: Plantules de tomates traitées préventivement par voie racinaire et inoculées par l'agent de la fusariose FOL.	45
Figure22: Plantules de tomates issues de semences traitées et inoculées par l'agent de la fusariose FOL.	46
Figure23: Plantules de tomates traitées préventivement par voie racinaire et inoculées par l'agent de la pourriture grise <i>Botrytis cinerea</i> .	47
Figure24 : Plantules de tomates issues de semences traitées et inoculées par l'agent de la pourriture grise <i>Botrytis Cinérea</i> .	47
Figure 25: Plants de tomate cv Marmande cultivés dans une chambre humide à une température de 25°C et une photopériode de 16h/8h.	53
Figure 26 : Principaux flavonoides trouvés dans l'extrait polyphénolique du thym	59
Figure 27 : Chromatogramme HPLC montre le pic qui correspond au thymol à 254nm.	60
Figure 28: Confirmation de la présence du spectre typique de l'acide salicylique dans l'extrait hydroalcoolique de thym	61
Figure 29: Expression des gènes de défense (PR1P4, PR1P6, le chitinase 4 et la $\beta$ -glucanase1) 24hpt et 48hpt par pulvérisation de l'extrait de thym sur plants de tomate cv Marmande.	62
Figure 30: Electrophorèse des extraits de feuilles de tomate 48hpt par pulvérisation de l'extrait de thym et de BABA.	63
Figure 31: Western blot des extraits des feuilles de tomate 48hpt par pulvérisation de l'extrait de thym et l'acide salicylique.	63
Figure 32: Extrait de métabolites de tomate traité par pluvérisation de l'extrait de thym	64
Figure 33: Rats wistar logés dans des cages métaboliques individuelles	70
Figure34: Vacuolization hépatocellulaire centrolobulaire chez le groupe AC70 (X200)	74
Figure 35: Inflammation prébronchiale et périvasculaire minimale chez les deux groupes EP50 et AC70 (x40).	75
Figure 36: Scores plot et loadings plot dérivés des spectres $^1\text{H-NMR}$ d'urine des rats traités par l'extrait polyphénolique de thym	77
Figure 37: Scores plot et loadings plot dérivés des spectres $^1\text{H-NMR}$ d'urine des rats traités par l'extrait polyphénolique de thym	78
Figure38: Spectres $^1\text{H-NMR}$ d'urine des rats traités par l'huile essentielle de thym.	80
Figure39: Spectres $^1\text{H-NMR}$ d'urine des rats traités par l'extrait polyphénolique de thym.	80

## Liste des tableaux

	P.
Tableau 1: Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i> L.	04
Tableau 2: Propriétés des différentes familles de protéines PR	13
Tableau 3 : Gènes de résistance chez la tomate	21
Tableau 4: Pathogenesis-related gènes et protéines chez la tomate	23
Tableau 5: Les caractéristiques morphologiques observées pour les trois isolats	36
Tableau 6: Taux de germination des semences de tomate cv saint pierre exposées aux substances volatiles des extraits de thym.	43
Tableau 7: Variation des moyennes de consommation et des poids corporels selon les traitements appliqués.	74
Tableau 8: Valeurs en moyenne des paramètres hépatiques et rénales chez des rats traités par les extraits de thym et des témoins.	76

## Liste des abréviations

<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton
<b>AC70</b>	acétone dilué à 70%
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>Alb</b>	Albumine
<b>Alt</b>	<i>Alternaria</i>
<b>BABA</b>	Acide β-aminobutyrique
<b>Bc</b>	<i>Botrytis cinérea</i>
<b>BHT</b>	Butylhydroxytoluène
<b>BUN</b>	Blood Urea Nitrogen
<b>CRE</b>	Créatinine
<b>CPA</b>	Principal Component Analysis
<b>D2O</b>	Deuterium oxide
<b>DPPH</b>	Diphenylpicrylhydrazyl
<b>EP20</b>	extrait polyphénolique dilué à 20%
<b>EP50</b>	extrait polyphénolique dilué à 50%
<b>ET</b>	Ethylène
<b>FORL</b>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici</i>
<b>FOL</b>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>
<b>GA</b>	acide gibberllique
<b>GOT</b>	Glutamooxaloacétate Transférase
<b>GPT</b>	Glutamopyruvate Transférase
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>HE</b>	Huile essentielle

<b>HE2</b>	huile essentielle diluée à 2%
<b>HE02</b>	huile essentielle diluée à 0.2%
<b>HPLC</b>	High-performance liquid chromatography
<b>JA</b>	acide jasmonique
<b>hpt</b>	heures post traitement
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LDH</b>	Lactate Deshydrogénase
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>PIs</b>	Pourcentage d'inhibition de la sporulation
<b>PR-</b>	Pathogenesis-related-
<b>PLS –DA</b>	Partial least squares Discriminant Analysis
<b>Phyt.inf</b>	<i>Phytophthora infestans</i>
<b>PCR</b>	Réaction en chaîne par polymérase
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcriptase PCR
<b>SA</b>	Acide salicylique
<b>SAR</b>	systemic acquired resistance
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>T- Bil</b>	Total-bilirubine
<b>TSP</b>	Trimethylsilyl propanoic acid
<b>T-Pro</b>	Total-Protéine
<b>Ti</b>	Taux d'ihnibition
<b>UA</b>	Urique acid
<b>UV-DAD</b>	Ultraviolet Diode Array Detector

# **Introduction générale**

## Introduction générale

Les maladies des plantes ont toujours préoccupé les agriculteurs et les phytopathologistes. La présence des agents phytopathogènes dans l'environnement peuvent causer des dommages sévères. Qu'il s'agisse des bactéries, champignons ou virus, les dégâts peuvent atteindre la destruction totale des cultures à l'instar du mildiou, causée par *Phytophthora infestans*. La lutte chimique reste la solution la plus efficace pour lutter contre ces maladies. Cependant, les inconvénients liés à l'utilisation et l'épandage intensif de ces produits chimiques prennent, ces dernières années, de l'importance à travers les études et les recherches focalisées sur la toxicité des pesticides conventionnels vis-à-vis de l'environnement et la santé humaine en générale et celle de l'agriculteur en particulier. D'autre part, la biodiversité est menacée par les effets indésirables voire néfastes des produits phytosanitaires conventionnels sur la microflore, la microfaune des sols et sur les insectes utiles. En outre, le phénomène de l'accoutumance des agents phytopathogènes qui peut conduire progressivement à une tolérance totale des souches vis-à-vis des produits ayant marqués leurs efficacités durant des années. La situation s'aggrave de plus en plus ; la recherche des alternatives aux produits chimiques devient primordiale.

À cet égard, les scientifiques sont de plus en plus à la recherche d'alternatives moins dangereuses, comme l'exemple des pesticides d'origine végétales plus respectueuses de la santé des humains en particulier les agriculteurs et de l'environnement.

Les plantes médicinales et aromatiques ont toujours joué un rôle important dans le monde de la médecine, la composition de parfums et la préparation des aliments. Certaines de ces plantes ont été utilisées depuis des générations comme remèdes populaires après leurs préparations par des moyens traditionnels comme la décoction, l'infusion ou la macération. Les extraits de ces plantes contiennent un certain nombre de composés chimiquement bien définies qui peuvent agir comme des drogues de synthèse. Néanmoins, de nombreuses plantes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne et certaines d'entre elles sont si communes que nous ne soupçonnons même pas leur nature toxique. D'après Ozturk et *al.*, (2008) toute plante indigène ou introduite peut être toxique, y compris des fougères, des plantes herbacées, des arbustes ligneux et des arbres. Plusieurs études ont été réalisées avec des extraits de plantes, mais très peu de recherches ont été menées pour étudier les effets toxiques de ces extraits ou de leurs constituants. De ce fait, l'étude de la toxicité des extraits naturels devrait être une préoccupation pour les chercheurs autant que leurs activités biologiques.

*Thymus vulgaris* L. appartient à la famille des Lamiacées et des herbes aromatiques indigènes dans la région méditerranéenne. Le Thym possède divers effets bénéfiques ; antiseptiques, antimicrobiennes, bactéricides, vermifuges, des propriétés antioxydantes et il a récemment été proposé comme une alternative naturelle aux antioxydants synthétiques (Rasooli et al., 2006, Abd El -Kader et Mohamed, 2012). De nombreux chercheurs s'intéressent à étudier *in vitro* et *in vivo* ses pouvoirs antimicrobiens et antioxydants (Kačániová et al., 2012; Proestos et al., 2013), les effets anti- tumoraux et hépatoprotecteurs (Ait M'barek et al., 2007; Özkan et Erdoğan, 2011; El -Banna et al., 2013) . Ainsi que ses potentialités inhibitrices vis a vis des agents phytopathogènes dans le but de son utilisation comme un biopesticide (Koul et al. 2008; Tripathi et al., 2009; Modarres Najafabadi et al., 2012).

C'est dans cette optique que ce travail vise à étudier l'efficacité de deux extraits de Thym; l'huile essentielle et l'extrait polyphénolique *in vitro* sur quelques agents phytopathogènes autochtones, et *in vivo* afin d'évaluer ses pouvoirs supprimeurs contre deux maladies, tellurique (fusariose) et foliaire (pourriture grise). De même que l'étude de l'origine de l'efficacité de ces extraits par l'analyse de l'effet éliciteur de la défense par des essais préliminaire sur :

- l'induction de l'expression de quelques gènes de défense par une analyse qRT-PCR ;
- la synthèse des protéines de défense par une analyse électrophorétique ;
- la synthèse de la protéine PR-1 par la technique westernblot.

Une dernière partie, vise à étudier la toxicité prédictive de deux extraits par des méthodes classiques telles que la chimie clinique et l'histopathologie, ainsi que par un outil plus innovant via une approche métabonomique. Cette dernière identifie les signatures métaboliques reflétant les altérations biochimiques qui se produisent dans une maladie ou à la suite de l'exposition à une substance toxique (Duquesne et al., 2012). L'analyse spectroscopique <sup>1</sup>H-RMN des liquides biologiques s'est avérée être l'une des techniques les plus puissantes pour étudier la réponse des organismes aux xénobiotiques. (Shockcor et Holmes, 2002)

**PARTIE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

***Thym commun***

# CHAPITRE I

## Thym commun

### I.1. GENERALITES

Le genre *Thymus* appartient à la famille des Lamiacées (Labiées), il comprend 350 espèces répandues dans le monde entier (Al-Fatimi et *al.*, 2010) ses espèces sont économiquement importantes en raison de leur utilisation dans la médecine populaire, pour la saveur et l'amélioration organoleptique, ainsi que dans la conservation des aliments (Senatore, 1996). Le nom "*Thymus*" dérive du mot grec « thymos » qui signifie "parfumer" à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante., 2001). L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Iserin., 2001), cette plante à longtemps été utilisé comme source de l'huile essentielle (huile de thym) et d'autres constituants (le thymol, flavonoïdes, l'acide caféïque et l'acide labiatique) provenant de différentes parties de la plante (Leung et Foster, 1996). Parmi les dénominations internationales de cette espèce :

**Français :** thym vulgaire, thym des jardins, farigoule, frigoule, barigoule, thym commun, thym cultivé.

**Anglais:** common thyme, garden thyme, culinary thyme, french thyme, winter thyme.

**Espagnol:** farigola, tem, timo, tomillo comun, tomizo.

**Arabe:** Zaitra, زعيرة

### I.2. ORIGINE ET REPARTITIONS GEOGRAPHIQUE

*Thymus vulgaris* L. est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (Özcan et Chalchat., 2004; Amiot., 2005). Le *Thymus vulgaris* se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (Kaloustian et *al.*, 2003). Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne (Poletti., 1988).

### I.3. CLASSE SYSTEMATIQUE

Ce classement se réfère à une classification botanique antérieure selon Morales (2002). Cette classification est présentée dans le tableau 01.

Tableau 1: Classification botanique de *Thymus vulgaris L.*

<b>Règne</b>	Plantes
<b>Sous Regne</b>	Plantes vasculaires
<b>Embranchement</b>	Spermaphytes
<b>Sous Embranchement</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Sous Classe</b>	Dialypétales
<b>Ordre</b>	Labiales
<b>Famille</b>	Lamiacées
<b>Genre</b>	<i>Thymus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Thymus vulgaris L.</i>

### I.4. DESCRIPTION BOTANIQUE

*Thymus vulgaris L.* est un arbuste aromatique à tiges ramifiées. Pouvant atteindre 40 cm de hauteur (Fig.1). Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords, de couleur vert foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes appelés trichomes (Fig.2). Ces dernières sont des structures histologiques spéciales pour la synthèse et la réservation des huiles essentielles; qui contiennent majoritairement des composés terpéniques. Les petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet. *Thymus vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton., 1999 ; Morales., 2002)

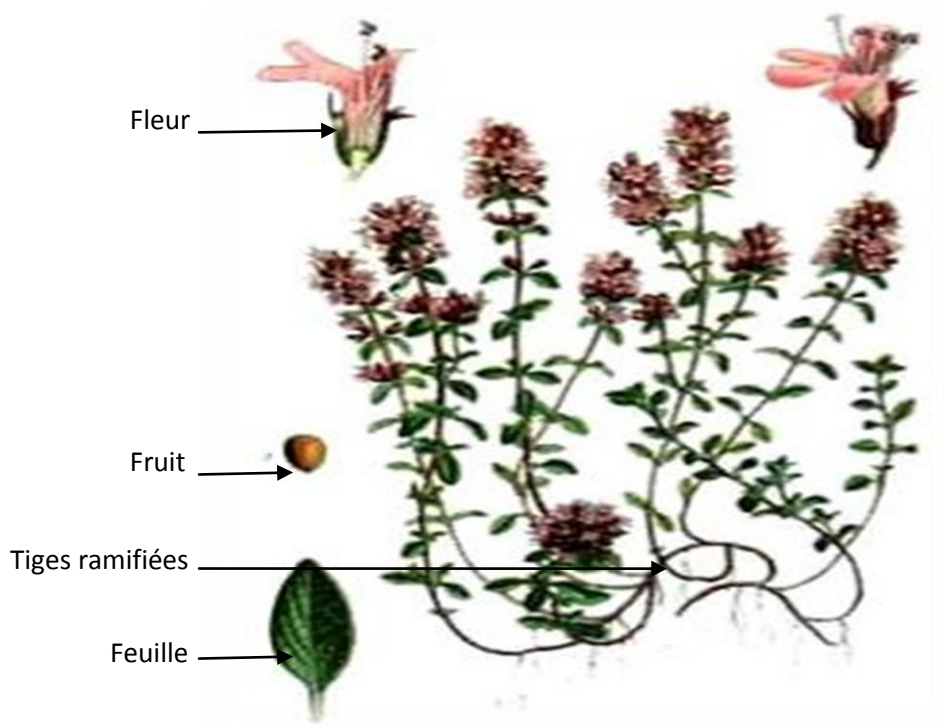


Figure 1: Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L. (Iserin., 2001).

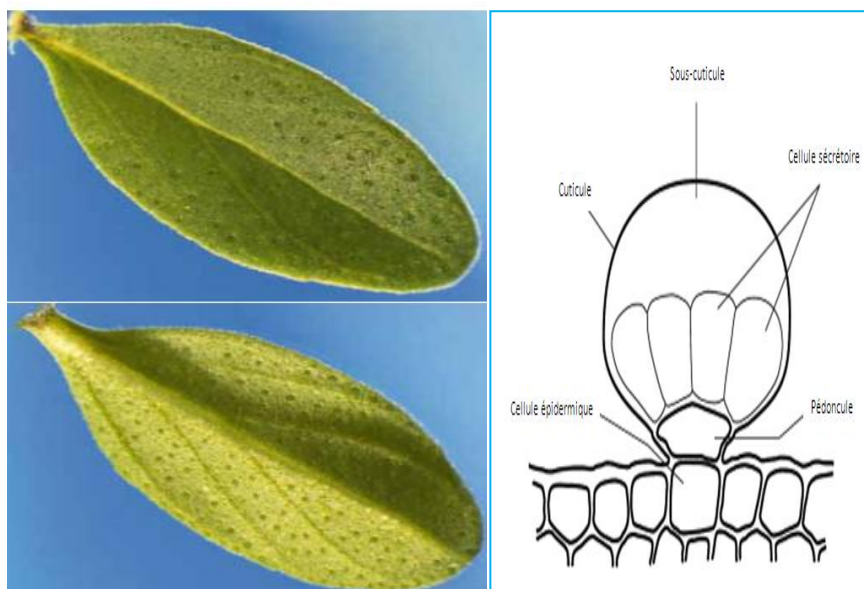


Figure 2 : Trichomes glandulaires sur le côté adaxial (en haut) et abaxial (en bas) d'une feuille de thym, composés des cellules sécrétoires et d'une cavité de stockage.

## I.5. COMPOSITION CHIMIQUE

Industriellement, les huiles essentielles de plantes sont produites à partir de plusieurs sources botaniques, dont beaucoup sont des membres de la famille de Lamiaceae. (Koul et al., 2008). De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants (Fig.03), dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'extraction. Malgré la différence dans la composition, les huiles essentielles présentent un certain nombre de caractères communs. Ce sont généralement des liquides à la température ordinaire, d'odeur aromatique forte. (Ghesten et al., 2001). Elles sont rarement colorées très fluides et très volatils sous l'effet de la chaleur (Bruneton., 1999).

Le thym est très connu par son polymorphisme chimique. Cette plante exprime six formes de chémotypes différents, chaque chémotype est nommé suivant le composant principal de son huile essentielle (Amiot., 2005). Autrement dit, le chémotype est défini par le produit chimique dominant dans le produit (Keefover-Ring, 2009). D'après Hudaib et al. (2002), l'huile essentielle de thym s'est avérée riche en phénols monoterpéniques actifs (thymol et carvacrol) et de leurs précurseurs hydrocarbures terpéniques correspondants (p-cymène et  $\delta$ -terpinène).

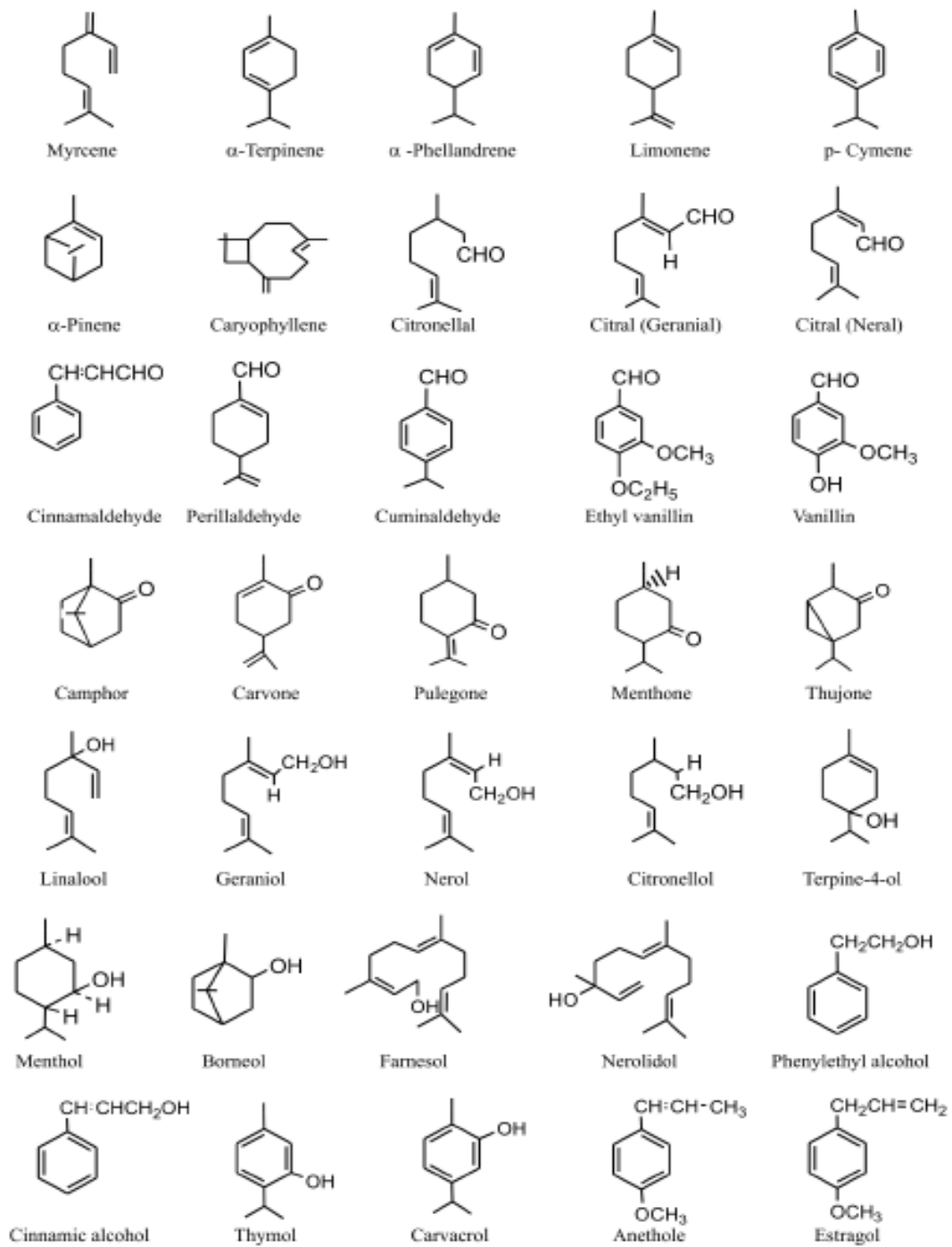


Figure 3: Structures chimiques de quelques constituants des huiles essentielles (Koul et al., 2008).

## I.6. ACTIVITES BIOLOGIQUES

Les recherches actuelles réalisées sur les effets des extraits de cette plante sur différents systèmes *in vitro* et *in vivo* ont ressorti plusieurs effets de grande importance pour la médecine, la pharmacie et l'industrie moderne, parmi lesquelles on cite les plus importants :

### I.6.1. Effets Antioxydants

Différents composés de thym lui permettent de posséder un pouvoir antioxydant, comme les deux phénols terpeniques; thymol et carvacrol. Ces constituants inhibent la peroxydation lipidique induite *in vitro* au niveau des mitochondries et des microsomes. Des études récentes indiquent que *Thymus vulgaris* est un puissant antioxydant et assure des doses élevées d'acides gras essentiels dans le cerveau (Iserin., 2001). Les principaux composés aromatiques volatils trouvés dans les extraits de basilic et de thym présentaient des quantités variables de l'activité anti-oxydante. En particulier, l'eugénol, le thymol, carvacrol et 4-allylphénol, présentaient une activité antioxydante comparable aux antioxydants connus, BHT et  $\alpha$ -tocophérol (Lee et al., 2004).

En général, les propriétés antioxydantes et antiradicalaires d'extraits végétaux sont associées à la présence de composés phénoliques possédant la capacité de piéger les radicaux libres. De nombreux rapports indiquent une bonne corrélation entre la RSA et la concentration des composés phénoliques. Selon les travaux de Bouhdid *et al.*,(2006), l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L évaluée par deux méthodes différentes : la technique de décoloration de la  $\beta$  carotène et le test du DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl) montre que cette essence exerce une activité antioxydante *in vitro* très puissante.

### I.6.2. Effets Antimicrobiens

L'huile essentielle de thym, riche en phénols, est douée de propriétés antibactériennes puissantes (Bruneton., 1999). L'huile essentielle de trois plantes dont *Thymus vulgaris* a été testée, par Bouhdid et ses collaborateurs (2006), pour leur activité antibactérienne, l'huile de *Thymus vulgaris* témoigne d'une activité antibactérienne intéressante sur des bactéries Gram positives comme sur les bactéries Gram négatives. En effet, *Listenia monocytogènes*, souche hautement pathogène, présente une sensibilité élevée vis-à-vis de cette essence.

D'après Ettayebi et al. (2000), l'activité de l'huile du thym est plus efficace contre les bactéries gram positive que contre les gram négatifs. Selon ces mêmes auteurs, l'importante activité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est associée à la présence de thymol qui est majoritaire dans cette huile. Thuille et al. (2003), expliquent l'efficacité de l'extrait hydroalcoolique du thym comparée à l'aqueux par la présence du thymol, qui cause la perforation des membranes bactériennes et le flux rapide des composants cytosoliques.

En plus de l'activité antibactérienne, des études (réalisées *in vitro* et *in vivo*) ont prouvé que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à thymol possède des propriétés antifongiques contre un certain nombre de mycètes. Reddy et al. (1998), dans leur étude, ont montré le potentiel antifongique élevé de l'huile volatile de *Thymus vulgaris* comme agents protecteurs des fruits de fraise (*Fragaria ananassa*) contre la détérioration causée par *Botrytis cinerea* et *Rhizopus stolonijer*.

### **I.6.3. Effets insecticides:**

Les plantes aromatiques méditerranéennes et leurs composants allélochimiques semblent avoir un pouvoir potentiel dans les stratégies de lutte intégrée. Ils contiennent plusieurs familles de molécules allélochimiques, qui ont différents effets insecticides sur de nombreux insectes (Regnault-Roger et al., 2004). Néanmoins, la sélectivité des différents produits étudiés peut être très variable. Par exemple, il a été parfois constaté avec certaines matières actives que les insectes auxiliaires se trouvaient également affectés alors qu'ils représentent un moyen de lutte biologique très efficace (Piasentin, 2010). D'après Koul et al. (2008) Bien que de nombreux composés monoterpéniques ont des propriétés insecticides, le degré de toxicité des composés pour une même espèce diffère considérablement.

Afin d'obtenir une formulation qui pourrait être commercialisable l'équipe de Moretti (2002) a procédé à une microencapsulation des huiles essentielles; la toxicité de ces microcapsules s'est traduite par une paralysie des chenilles, dont l'action est maximale quand les microparticules se fixent aux poils des chenilles. Etudiant le mode d'action sur des larves de taupins Waliwitiya et al., (2009) ont conclu que le thymol; composé majoritaire de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* cause une hyperactivité initiale suivie par une hyper-extension du segment abdominal, une paralysie prolongée et puis la mort.

## I.7. EFFETS SECONDAIRES ET TOXICITE

Les extraits naturels et particulièrement les huiles essentielles sont très connus par leurs activités biologiques. Cependant, Il est reconnu que les huiles essentielles contiennent différents composés et que l'effet synergique ou additif de plusieurs constituants évalués par des tests toxicologiques demeure inconnu (Costa et *al.*, 2011). Selon ce dernier, bien que des espèces qui présentent une utilisation répandue en médecine traditionnelle comme *Cymbopogon citratus* (citronnelle), il n'existe pas de données scientifiques sur l'efficacité ou l'innocuité après des traitements répétés. Dans des essais de toxicité subaiguë de l'huile essentielle de *Zingiber officinalis* effectués par El-Banna et *al.* (2010), une diminution du poids corporel est observée après l'administration de l'huile essentielle et ceci pourrait être le résultat d'une diminution de la prise alimentaire de ces animaux.

Les données d'Al-Badr (2011), montrent que l'huile essentielle de thym injectée aux rats a un effet inoffensif sur le foie et les reins en raison de l'induction de petits changements dans l'activité aminotransférase.

# **Induction de la défense**

## CHAPITRE II

# Induction de la défense chez les végétaux

### II.1. GENERALITES

Lors d'une attaque, les plantes mettent en place des mécanismes de défense, pour altérer la progression de l'invasion. Parmi les réponses rapides, la formation de dépôts entre la paroi et la membrane, caractérise la formation d'appositions et constitue une barrière physique à la progression de l'infection. Diverses composés de défense peuvent être synthétisés suite à l'infection de la plante par un agent pathogène (Van Loon et *al.*, 2006). Une blessure mécanique peut également potentialiser la défense des plantes ; comme c'est le cas chez *Arabidopsis thaliana* où une blessure induite par pincement de la feuille diminue le développement du pathogène *B. cinerea* par une forte production de phytoalexines (Chassot et *al.*, 2008).

Les mécanismes de défense locale ou systémique nécessitent qu'un signal soit généré, transporté, perçu et traduit afin d'activer des gènes inductibles. Pour assurer un état de résistance efficace, différentes stratégies sont possibles. Suivant la biologie du parasite et la nature du parasitisme, la plante adaptera ses réponses par une régulation fine de ses mécanismes de défense sous le contrôle de ses hormones dont elle va orienter les fonctions (Jalloul et *al.*, 2009).

### II.2. METABOLITES SECONDAIRES IMPLIQUES DANS LA DEFENSE NATURELLE

#### II.2.1. PR Protéines et phytoalexines

Les plantes possèdent des systèmes de défense active et peuvent se protéger de l'invasion du pathogène par la sécrétion d'une variété de petites protéines antimicrobiennes ou antifongiques (Asano et *al.*, 2013). Selon Alkahtani et *al.* (2011) les protéines PR « related pathogenesis » sont des monomères de poids moléculaire assez faible ; de 8 à 50 KDa, elles sont très stables en milieu acide et résistent à l'action produite par la plante elle-même ou par les agents pathogènes (Pajot et Regnault-Roger, 2008). Les protéines PR sont classées en différentes familles en fonction de leurs séquences d'acides aminés et l'activité enzymatique ou biologique (Yadav et *al.*, 2013).

Ces protéines sont représentées par 17 familles de protéines (tableau 2), y compris la  $\beta$ -1, 3-glucanase, les chitinases et les peroxydases. Ces protéines ont été montrées pour être directement impliquées dans l'immunité de la plante associée à des mécanismes de protection.

PR-1 sont les protéines les plus abondantes qui présentent des propriétés anti-fongiques à des niveaux micromolaires contre divers champignons pathogènes (Yadav et *al.*, 2013). Selon Kumakech et *al.* (2013) l'activité biologique des PR-1 est encore inconnue, mais probablement a une activité antifongique.

Tableau 2: Propriétés des différentes familles de protéines PR (Van Loon et *al.*, 2006)

<b>Famille</b>	<b>Propriétés</b>	<b>Contrôl</b>
PR-1	Inconnu	SA
PR-2	$\beta$ -1,3-glucanase	SA
PR-3	Chitinase type I,II,IV, V, VI, VII	JA
PR-4	Chitinase type I,II	JA
PR-5	Thaumatine-like	SA
PR-6	inhibiteur de protéinase	JA
PR-7	endoprotéinase	SA et JA
PR-8	chitinase type III	SA et JA
PR-9	peroxydase	
PR-10	ribonucléase-like	JA
PR-11	chitinase type I	
PR-12	défensine	JA
PR-13	Thionine	JA
PR-14	protéines de transfert de lipides	
PR-15	oxalate oxidase	
PR-16	oxalate-oxidase-like	
PR-17	Inconnu	

Les phytoalexines sont des molécules issues de métabolismes secondaires, de faible poids moléculaire. Elles sont produites extemporanément et s'accumulent au voisinage des sites d'infection (ne sont pas systémiques). De ce fait, ces molécules jouent un rôle majeur dans la résistance aux pathogènes, notamment la mise en place de la LAR (Pajot et Regnault-Roger, 2008). Parmi les membres de cette famille, on trouve notamment le resvératrol, le picéatannol, et encore bien d'autres composés dont la structure est basée sur un motif stilbénique (Fig.4).

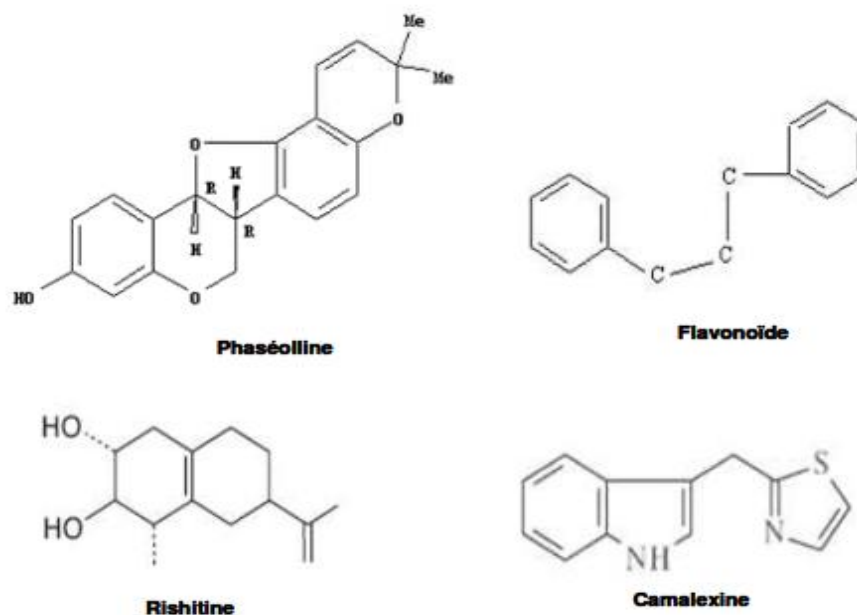


Figure 4: Exemples de phytoalexines chez quelques plantes (Adam, 2008).

Les phytoalexines sont absentes des tissus sains et sont certainement le résultat de la synthèse par des enzymes en réponse à l'infection (Morrissey et Osbourn, 1999). Il est bien connu que les phytoalexines jouent un rôle important dans le mécanisme de défense contre les infections fongiques dans les plantes. Ils indiquent que les phytoalexines sont des substances hautement toxiques pour les champignons avec la capacité de limiter la croissance des hyphes. (Alkahtani et al. 2011)

### II.2.2. Composés phénoliques et renforcement pariétal

Une des stratégies défensives les plus rapides est le renforcement de la paroi végétale ou l'apposition de structures appelées papilles. Le renforcement pariétal s'effectue via l'accumulation de lignine et d'autres composés phénoliques (Barbosa Cavalcante, 2009).

La callose est un polymère de  $\beta$ -1,3-glucanes, elle est très souvent synthétisée dans les papilles mises en place rapidement après détection d'un pathogène (De Bernonville, 2009), elle peut facilement être observée par fluorescence après marquage au bleu d'aniline.

Le dépôt rapide de certaines de ces molécules sous le point de pénétration du parasite forme une papille bloquant ainsi la progression de l'agent pathogène (Uma et al., 2011). D'après Dubreuil (2011), le renforcement de la paroi cellulaire résulte d'une réorganisation structurale et chimique grâce au dépôt de molécules nouvellement synthétisées comme la lignine et la callose, l'accumulation de composés phénoliques et le recrutement de protéines au niveau de la paroi cellulaire. Les formes réactives de l'oxygène (ROS) interviennent aussi dans le processus de renforcement des parois, Masuta et al. (1991) rapportent un épaissement de la paroi lié à l'accumulation de ROS, en réponse aux traitements par le SA et l'éliciteur fongique chitosan. Selon Hüchelhoven (2007) les ROS jouent un rôle clé dans le renforcement de la paroi; l'accumulation de  $H_2O_2$  suivant le burst oxydatif déclenche la lignification via l'activité des peroxydases et la formation des liaisons entre protéines pariétales.

### II.3. ELICITEURS ET INDUCTION DE LA RESISTANCE

Ce sont des substances capables de provoquer des réactions de défense chez les végétaux, qui sécrètent alors des molécules s'opposant à l'implantation ou au développement des agents pathogènes (Fig.5) (Pajot et al., 2007).

La stimulation des défenses naturelles des plantes à l'aide de composés appelés éliciteurs constitue une nouvelle stratégie de protection des cultures alternative aux pesticides ou aux plantes transgéniques (Pajot et al., 2007). Cette nouvelle stratégie a fait l'objet d'un grand intérêt dans le domaine de la protection des plantes ces dernières années. Certains composés chimiques tels que l'acide salicylique (SA), l'acide dichloroisocotinique (INA) et le S-méthyl-ester de l'acide benzo-1,2,3-thiadiazole-7-carbothioïque (BTH) et l'acide  $\beta$ -aminobutyrique (BABA) sont capables de déclencher la SAR dans différentes plantes contre plusieurs pathogènes (Adam, 2008). A titre d'exemple, BABA est un acide aminé non protéique et non métabolisé par les plantes.

La résistance induite par le BABA emprunte des voies de signalisation différentes en fonction du pathogène et de l'espèce végétale. Ces voies ont été appréhendées *via* l'utilisation de divers mutants (Dubreuil, 2011).

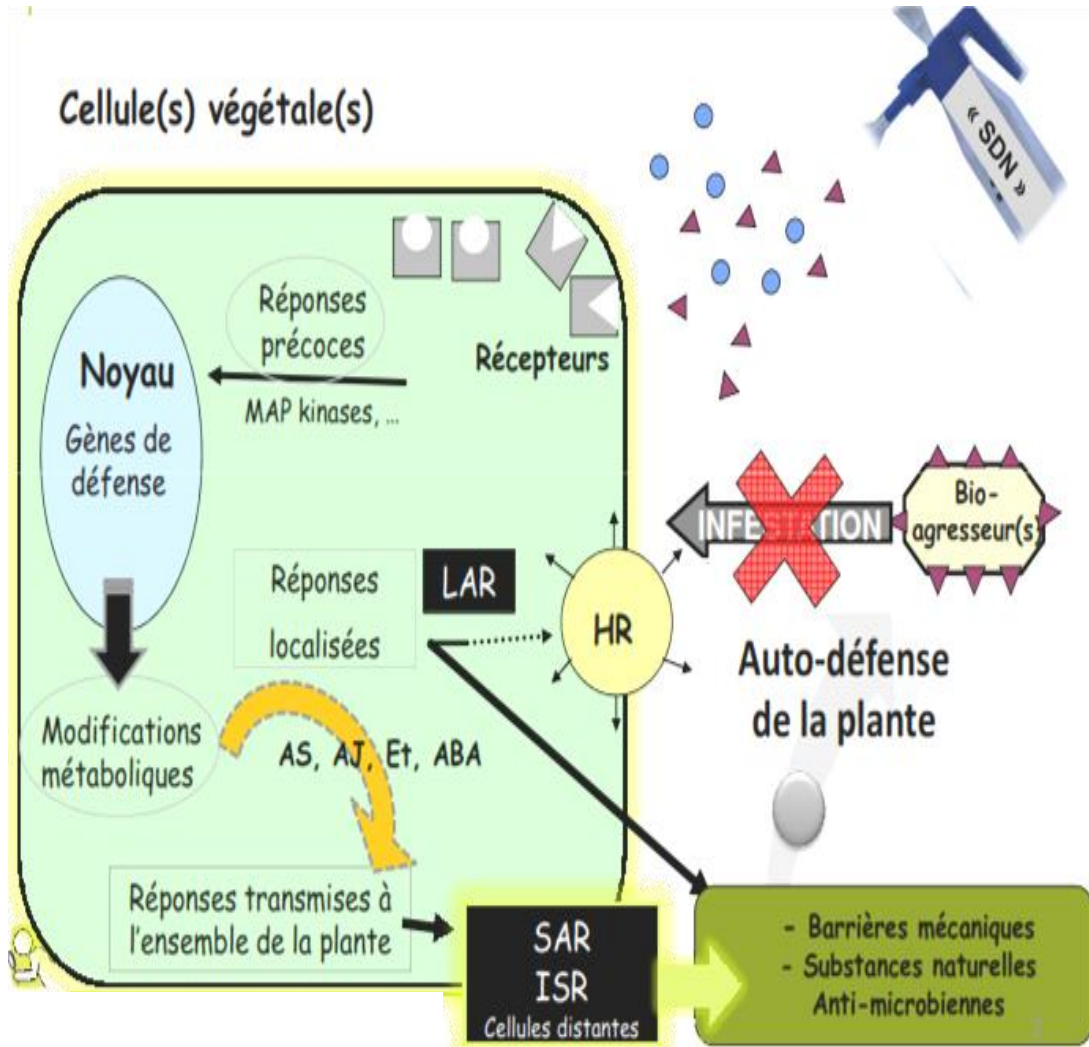


Figure 5: Induction des voies de défense chez les végétaux

Schéma d'après Guerrand (2003)

### **II.3.1. Phytohormones impliquées dans la résistance**

Chez les plantes, les hormones jouent le rôle de messagers, en régulant le métabolisme et l'activité cellulaire au moment de l'interaction avec un agresseur. La connexion et la coordination entre les différentes molécules permettra le progrès et l'optimisation de la stratégie de défense pour garantir un haut niveau de résistance à moindre coût énergétique. Parmi les voies les plus étudiées selon la littérature, la voie de l'acide jasmonique, de l'acide salicylique et la voie de l'éthylène.

#### ***II.3.1.1. La voie de l'acide jasmonique***

L'acide jasmonique (AJ) et ses dérivés sont des oxylipines, synthétisés suite à une peroxydation de l'acide linoléique. Les oxylipines sont connues pour leur rôle clé dans la régulation des différentes réponses de défense des végétaux (Farmer et *al.*, 2003). Selon Weber (2002) l'hydroperoxide d'acide gras polyinsaturé provenant de l'action de la LOX sur l'acide linoléique est transformé en acide jasmonique et en son ester méthylique (Fig.6). Ces composés induisent la transcription de gènes codant pour une famille de protéines de défense comme les inhibiteurs de protéases (Grechkin, 1998). C'est un métabolite secondaire ayant un rôle de signal dans les réactions de défense, dont la HR stimule l'expression des gènes de production des phytoalaxines. Sasaki- Sekimoto *et al.* (2005) ont montré l'induction par le MeJA des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse de l'ascorbate et du glutathion ainsi que leur accumulation.

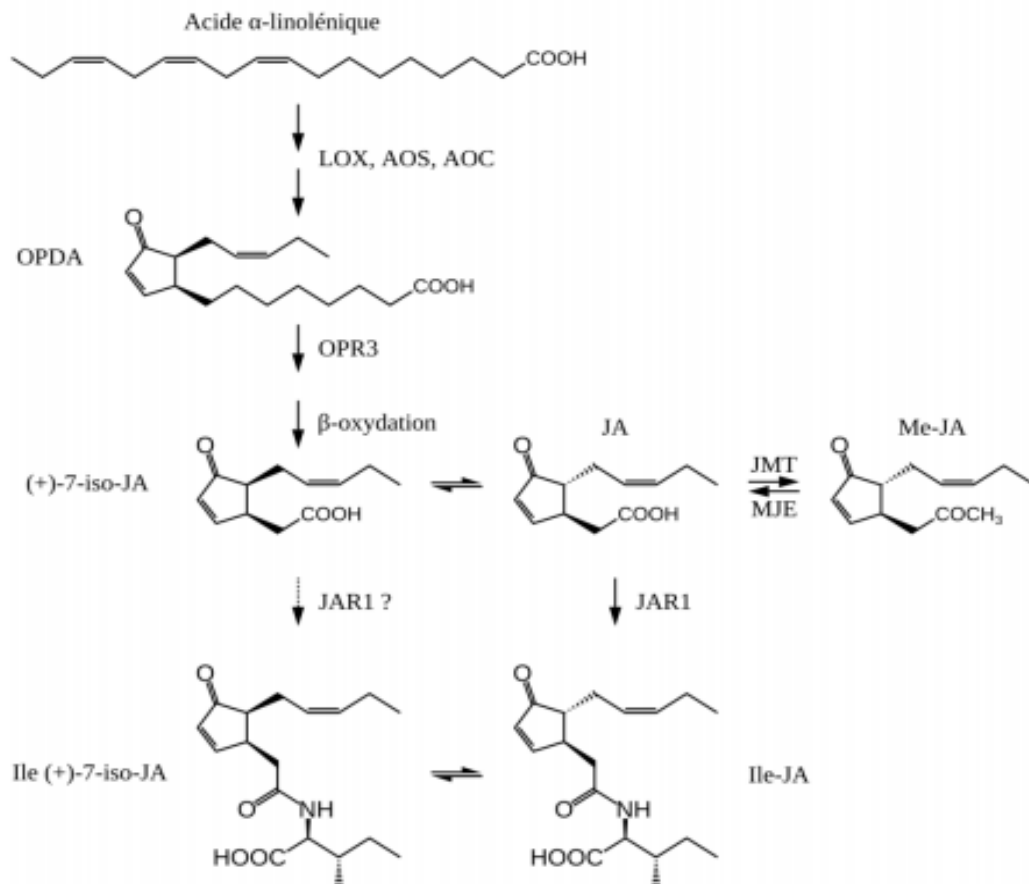


Figure 6: La voie des jasmonates; biosynthèse et modification de l'acide jasmonique d'après Fonseca et al. (2009).

### II.3.1.2. Voie de l'acide salicylique

C'est un métabolite secondaire qui fait partie des composés phénoliques, issu de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, sa structure chimique est très proche de l'aspirine. La synthèse d'acide salicylique sur le site d'infection permet à la plante de signaler une attaque en cours et de déclencher divers systèmes défensifs locaux et systémiques dans des zones indemnes. L'AS est souvent présenté comme le signal systémique de la SAR (Pagot et Regnault-Roger, 2008). La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est une enzyme clé de la voie des phénylpropanoïdes aboutissant, entre autres, à la synthèse de l'AS (Fig.7), à celle de molécules composant la lignine où à la synthèse de précurseurs qui seront utilisés par d'autres voies

métaboliques pour générer des phytoalexines (Dixon et *al.*, 2002). Wildermuth et *al.* (2001) ont décrit une autre voie de synthèse à partir du chorismate *via* l'isochorismate par action de l'isochorismate synthase (ICS) dans *Arabidopsis* infecté par un pathogène. Le SA et ses analogues fonctionnels comme benzothiadiazole S-méthyle-ester (BTH) et l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA) induisent des gènes PR en permettant une meilleure résistance contre les pathogènes.

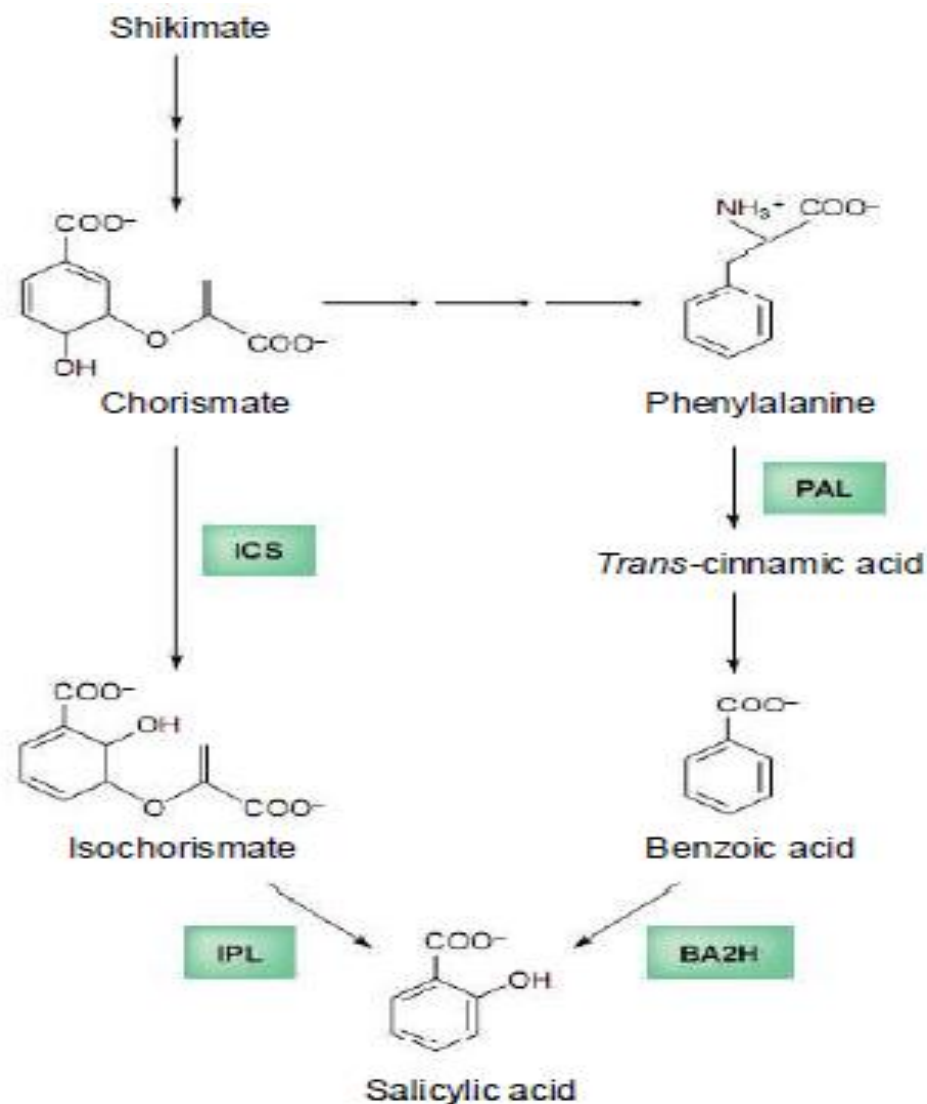


Figure 7: Voie de biosynthèse de l'acide salicylique chez *A.thaliana*. PAL : phénylalanine-lyase ; IPL : isochorismate pyruvate lyase ; BA2H : benzoic-acid-2-hydrolase ; ICS : isochorismate synthase (Shah, 2003).

### **II.3.1.3. Voie de l'Éthylène**

L'éthylène (ET) est une phytohormone gazeuse, en plus de son rôle dans la croissance des plantes et de leur développement, l'éthylène est impliqué dans la régulation des réponses des plantes aux stress biotique et abiotique (Dghim, 2012).

Selon van Loon et *al.* (2006), l'éthylène en déclenchant des réponses de défense pourrait inhiber le développement de symptômes en réponse à un pathogène nécrotrophe. Par contre, il pourrait augmenter la mort cellulaire provoquée par les pathogènes biotrophes. Le rôle de l'éthylène comme régulateur dans la défense n'est pas tout à fait éclairci. Cependant, il a été démontré que cette hormone induit préférentiellement les protéines PR basiques (Ramírez-Suero, 2009). La place de ET dans la résistance apparaît plus diversifiée que celle d'autres hormones ; son importance et sa finalité vont dépendre du type de parasite, de la nature du parasitisme et de la famille de plantes concernées (Jalloul et *al.*, 2009).

### **II.3.2. La synchronisation des voies de signalisation**

Les approches pharmacologiques et l'utilisation des différents mutants ont révélé la multiplicité et la diversité des interconnexions entre les voies de transduction du signal (Jalloul et *al.*, 2009). La transduction du signal est le résultat d'un réseau très complexe de régulation et de connexion entre les différentes voies (Ramírez-Suero, 2009). Dans certains pathosystèmes, le contrôle négatif de l'AJ passe par celle de l'AS via la protéine NPR1. D'après Jalloul et *al.* (2009) des analyses de microarrays suggèrent une action potentialisatrice de l'ET sur l'induction du gène PR1 dépendant de l'AS.

Dans le cas des interactions entre une plante et ses bioagresseurs, la régulation des actions des hormones apparaît comme un élément clé capable de faire pencher la balance, en faveur de l'un ou l'autre des protagonistes, vers la sensibilité ou la résistance (Lopez et *al.*, 2008). Les réactions de défense que contrôlent les hormones peuvent ainsi être inhibées ou stimulées chacune l'une par l'autre, laissant supposer l'intervention d'un système de régulation très subtil. D'autre part, l'ET agit de concert avec l'AJ qui, lui-même, peut bloquer les mécanismes activés par l'acide salicylique.

Selon Van Loon et Van Strien (1999), la SAR induite par un agent pathogène incompatible, est caractérisée par une accumulation d'acide salicylique (SA).

Il y a d'autres hormones impliquées dans la régulation de la réponse aux stress chez les végétaux ; comme le gibberellin, dont le niveau de GA bioactif dans la plante détermine le niveau de dégradation des DELLA, et donc le niveau de la potentialisation des réponses de JA, fournissant un mécanisme par lequel les deux voies de signalisation peuvent être liés (Colebrook et *al.*, 2014).

## **II.4. INDUCTION DE LA DEFENSE CHEZ LA TOMATE**

### **II.4.1. La défense chez la tomate**

La résistance chez la tomate peut être de type gène pour gène. A titre d'exemple, Il y a un gène de résistance à Pto de la tomate pour un gène d'avirulence AvrPto correspondant de *Pseudomonas syringae* pv tomato. Ou par l'activation d'une cascade d'évènements qui entrent dans le cadre de processus de défense de la plante vis-à-vis d'un bioagresseurs spécifique.

Parmi les gènes de résistance, on compte quatre classes ; TNL, CNL, RLP et miscellaneous (tableau 3). Les deux premières classes sont strictement intracellulaires, la troisième classe comprend des protéines transmembranaires avec des extensions à la fois extracellulaires et cytoplasmiques (Castroverde, 2010).

Tableau 3 : Gènes de résistance chez la tomate d'après Castroverde (2010) .

Classe	Gène de résistance	Pathogène	référence
<b>TIR-NBS-LRR (TNL)</b>	<i>Bs4</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	Schornack et al.,2004
<b>CC-NBS-LRR (CNL)</b>	<i>Am</i>	Alfalfa mosaic virus	Parrella et al.,2004
	<i>Hero</i>	<i>Globodera pallida</i> , <i>G.rostochiensis</i>	Ganal et al., 1995 ; Ernst et al.,2002 ; Poch et al., 2006
	<i>I2C</i>	<i>F.oxysporum</i>	Ori et al.,1997
	<i>I-3</i>	<i>F.oxysporum</i>	Hemming et al., 2004
	<i>Mi-1</i>	<i>Meloidogyne arnaria</i> ; <i>M.incognita</i> ; <i>M.javanica</i>	Rossi et al.,1998; Vos et al., 1998 ; Milligan et al., 1998 ; Kaloshian et al., 1998 ; Kaloshian et al., 1995.
	<i>Mi-1.2</i>	<i>Bemisia tabacci</i>	Nombela et al., 2003
	<i>Mi-9</i>	<i>Meloidogyne spp.</i>	Jablonska et al.,2007
	<i>Prf</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Salmeron et al., 1996
	<i>Sw-5</i>	Tospovirus	Brommonschenkel and Tanksley, 1997 ; Brommonschenkel et al., 2000
	<i>Tm-1</i>	Tomato mosaic virus	Meshi et al., 1988 ; Cottrell, 2005
	<i>Tm-2</i>	Tomato mosaic virus	Meshi et al.,1989
	<i>Tm-2-2</i>	Tomato mosaic virus	Lanfermeijer et al., 2003
<b>Receptor-Like proteins (RLP)</b>	<i>Cf-2</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	Dixon et al.,1996 ; Jones et al.,1998 ; Thomas et al., 1998
	<i>Cf-4</i>	<i>C.fulvum</i>	Thomas et al., 1997 ; Jones et al.,1998 ; Thomas et al., 1998
	<i>Cf-4A(Hcr9-</i>	<i>C.fulvum</i>	Takken et al.,1999 ; Takken et al., 1998
	<i>Cf-5</i>	<i>C.fulvum</i>	Dixon et al.,1998 ; Jones et al.,1998 ; Thomas et al., 1998
	<i>Cf-6</i>	<i>C.fulvum</i>	Grushtskaia et al.,2007
	<i>Cf-9</i>	<i>C.fulvum</i>	Jones et al., 1994 ; Hammond-Kosack et al., 1994 ; Hammond-Kosack et al., 1998
	<i>Cf-9B(Hcr9-</i>	<i>C.fulvum</i>	Parniske et al., 1999
	<i>Cf-ECP2</i>	<i>C.fulvum</i>	Laugé et al., 1999
	<i>Ve 1</i>	<i>Verticillium dahliae</i> , <i>V.albo-atrum</i>	Kawchuk et al.,2001; Fradin et al.,2009
	<i>Ve 2</i>	<i>V.dahliae</i> , <i>V.alboatrum</i>	Kawchuk et al., 2001
<b>Miscellaneous</b>	<i>Asc-1</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Brandwagt et al.,2002 ; Mesbah et al., 1999
	<i>Pot-1</i>	potyvirus	Ruffel et al., 2005
	<i>Pto</i>	<i>P.syringae</i>	Loh and Martin, 1995 ; Chang et al., 2002 ; Riely and Martin, 2001; Rommens et al.,1995
	<i>Ol</i>	<i>Oidium neolycopersici</i>	Bai et al., 2005 ; Li et al., 2007

#### II.4.2. Pathogenesis-related proteins chez la tomate

Chez les végétaux, il existe un groupe de gènes de défense qui comprend ceux codant pour les protéines PR qui constituent collectivement la majorité des changements protéine soluble au cours de la réaction de défense de la plante. Le terme « *pathogenesis-related Proteins* » a été signalé en 1986 pour définir les protéines codées par la plante hôte, et qui ne sont induites que dans des situations pathologiques; citant principalement les cas d'hypersensibilité (HR) et d'autres formes de résistance aux agents pathogènes. Ces protéines partagent un certain nombre de caractéristiques telles que un poids moléculaire relativement faible, l'accumulation dans l'apoplaste, une résistance élevée à l'activité protéolytique, et des points isoélectriques extrêmes (Van Loon, 1985).

Chez la tomate, la fusariose induit une augmentation de l'activité de 1,3 -B-glucanase (PR-2) et de chitinase (PR-3), laquelle était toujours plus élevée dans les plantes sensibles infectées (Ferraris, 1987). D'après Wasternack et *al.* (2006), cette molécule de signalisation est également le médiateur de la libération de l'acide linoléique et encore sa conversion en acide jasmonique, offrant un pont à d'autres voies de signalisation de défense de la plante (tableau 4).

Tableau 4: Pathogenesis-related gènes et protéines chez la tomate :

Famille*	Propriétés	Pathogène cible	Exemples	References
PR-1	Antifongique	Pathogène fongique	P14	Camacho-Henriquez and Sanger, 1984
			P4,P6	Van Kan et al.,1992
			P14a, P14b,P14c	Niderman et al.,1995
			C <sub>2</sub> ,C <sub>4</sub>	Granne et al.,1987
			PR-1b1, PR-1b2	Tornero et al.,1994
PR-2	Endo-beta-1,3-glucanase	Glucans	Cel 1 EGase	Real et al., 2004
			P3, P5	De Wit et al.,1986
			C3,C5	Granell et al., 1987
			P31,P36	Fischer et al.,1989
PR-3	Endochitinase	Chitine fongique	Q'a, Q'b	Domingo et al.,1994
			C6,C7	Granell et al., 1987
			P26, P30, P31	Fischer et al.,1989
PR-4	Endochitinase	Chitine fongique	P32, P34	Garcia Breijo et al.,1990
			P2	De Wit et al.,1986
PR-5	Thaumatine-like	Croissance mycélienne et germination des spores	AP24	Woloshuk et al.,1991
			NP24	King et al.,1988
			P23	Rodrigo et al.,1991
PR-6	Inhibiteur des protéinases	Insectes, protéinases microbiennes	Tomato inhibitor I	De Wit et al., 1986 ; Abuqamar et al.,2008
			Tomato inhibitor II	Granell et al.,1987
PR-7	Endopeptidase	Pathogénique protéines et peptides	P69	Vera and Conejero,1988
			P70	Fischer et al., 1989
			Rcr3	Krüger et al.,2002
PR-9	Peroxydase/peroxidase-like	Pathogénique réactive d'oxygène intermédiaire	Cevi-1	Vera et al.,1993
			TPX1	Botella et al.,1994
			TPX2	Yoshida et al.,2003
			STH-2	Constabel et al.,1993
PR-10	Ribonuclease	RNA viroses	STH-2	Constabel et al.,1993
PR-12	Defensine	Membranes des cellules microbiennes	tgas118	Van den Heuvel et al.,2001
PR-13	Thionin	Cytotoxique	Thi2.1	Chan et al.,2005
PR-14	Nonspecific lipid transfer proteins	Pathogènes bactériens et fongiques	LpLtp1, LpLtp2, LpLtp3	Trevino and O'Connell,1998 ; Le et al.,2006
PR-15	Oxalate oxidase		oxo	Zhou et al.,2008 ; Zhou et al.,2009
*PR-8, PR-11,PR-16 et PR-17 ne sont pas représenté dans le génome de tomate D'après Castroverde (2010)				

### II.4.3. Elicitation et voies de signalisation chez la tomate

La systemin est une hormone peptidique végétale impliquée dans la défense chez la famille des Solanacées (Fig.8). C'était la première hormone végétale qui a été prouvée être un peptide ayant été isolé à partir de feuilles de tomates en 1991. Elle est responsable de la régulation systémique de plus de 20 gènes de la défense chez la tomate, y compris ceux codant pour des inhibiteurs de protéases, les composants des voies de signalisation et les protéases (Ryan, 2000).

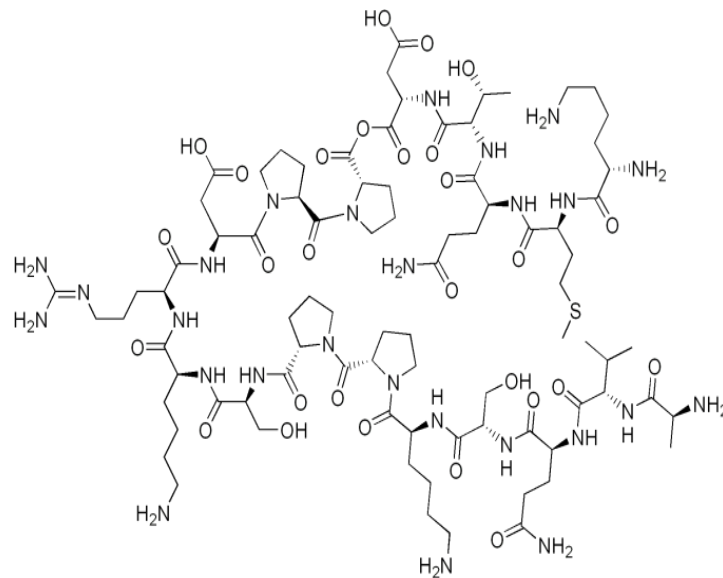


Figure 8: Structure chimique de la systemine

Chez la tomate l'acide jasmonique et son dérivé le méthyljasmonate (MeJa) jouent un rôle dans la stimulation, locale et à distance, de l'expression des inhibiteurs des protéases (Farmer et Ryan, 1990 ; in : pajot et Regnault-Roger, 2008). Utilisé en application foliaire sur des plants de tomates, le composé augmente le taux de polyphénol oxydase, une enzyme oxydative impliquée dans la résistance contre plusieurs insectes herbivores. Il a en outre l'avantage de ne pas causer d'effet négatif sur le rendement des tomates (Thaler, 1999).

D'après Pieterse et *al.* (2006) des réponses défensives dépendantes de l'acide jasmonique ont été conduites pour contribuer à la résistance de base chez la tomate contre les différents agents pathogènes et à jouer un rôle dans la régulation des réponses systémiques de la défense après l'attaque.

Mandel et *al.* (2013) ont étudié la résistance induite en culture hydroponique de la tomate (*Solanum lycopersicum*) contre *Ralstonia solanacearum* en utilisant trois éliciteurs, à savoir, le chitosane, l'acide salicylique, et l'acide jasmonique. Les résultats indiquent que les éliciteurs SA et CHT induisent des réponses de défense efficaces des plants de tomates contre *R. solanacearum*, ceci est lié selon ces chercheurs au renforcement de la paroi cellulaire par dépôt de lignine et de l'induction des enzymes de défense.

Selon les expériences de Mandel et *al.* (2009) l'application exogène de 200 mM d'acide salicylique sur le système racinaire et par pulvérisation foliaire pourrait induire une résistance contre *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* chez la tomate.

L'induction de la production des PR protéines est observée à la suite de l'application exogène des stimulateurs d'origines microbiennes. Il a été montré que la présence de *Pythium oligandrum* au niveau des racines de tomates attaquées par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* déclenche et amplifie la synthèse de protéines PR d'où l'induction d'une SAR (Le Floch, 2003).

**PARTIE**

**EXPÉRIMENTALE**

## Chapitre I : Efficacité des extraits de thym

### I.1. OBJECTIF

L'objectif de cette partie de travail est de préparer deux extraits de *Thymus vulgaris*, une plante médicinale et aromatique très riche en matières biologiquement actives pour évaluer l'effet de ses extraits :

- *in vitro* sur la croissance mycélienne et la sporulation de six agents phytopathogènes autochtones,
- *in vivo* sur le développement des maladies cryptogamiques pour évaluer s'il y a lieu leurs capacités suppressives.

### I.2. MATERIEL VEGETAL

Les sommités fleuries du Thym (Z'aitra) constitue le matériel végétal utilisé comme source de substances naturelles (Fig.9). Les échantillons sont prélevés dans la région d' Oued El-Kheir ; Wilaya de Mostaganem (Fig.10), ils sont séchés à l'ombre et mis à l'abri de l'humidité.



Figure 9: Echantillon de thym constitué principalement par les parties florales



Figure 10 : Zone de prélèvement des échantillons de thym (source : google Maps, 2014).

### I.3. PROCÉDES DES EXTRACTIONS

#### I.3.1. Extraction soxhlet

L'extraction des composés phénoliques est effectuée en utilisant le dispositif soxhlet (Fig.11), un échantillon de 0,5g de thym en poudre est placé dans un récipient contenant 20 ml d'éther de pétrole, laissé sous agitation à une température ambiante. La poudre sèche est ensuite transférée dans une cartouche en papier filtre épais pour enfin être placée dans le réservoir de l'extracteur soxhlet. Au cours du premier cycle de l'extraction, le solvant (150 ml de méthanol) contenant la matière à extraire retourne dans le ballon par déversements à travers le siphon situé dans le coude latéral. Après plusieurs cycles successifs d'extraction en continu, l'extrait récupéré est concentré par évaporation à sec à une température de 40°C à l'aide d'un rotavapor (Buchi heating Bath. B-490). Le résidu récupéré est solubilisé dans l'acétone à raison de 1/10 (Jordan et *al.*, 2009).

L'opération est répétée plusieurs fois dans le but d'avoir un volume suffisant pour effectuer les tests *in vitro* et *in vivo* prévus dans cette expérimentation. L'extrait obtenu est conservé à 4°C et à l'obscurité.



Figure11: Dispositifs d'extraction Soxhlet (A) et d'évaporation du solvant extractant (B).

### I.3.2. Extraction par hydrodistillation

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée par hydrodistillation (Fig.12). Un échantillon de 150g des sommités fleuries de *Thymus vulgaris* est mis dans un ballon contenant deux litres d'eau distillée, le mélange est porté à l'ébullition pendant environ 90min. La vapeur condensée dans le ballon, passe à travers le réfrigérant, le changement de température permet aux molécules entraînées par la vapeur de se condenser en petites gouttelettes constituant le distillat.

Le distillat contient deux phases ; huileuse et aqueuse. La séparation des deux phases est faite par décantation dans une ampoule à décanter, les gouttelettes d'eau restantes sont éliminées par l'ajout d'une faible quantité de carbonate de sodium anhydre. L'huile pure est récupérée dans un flacon brun et conservée à 4 °C.

La technique est répétée plusieurs fois, afin d'obtenir un volume suffisant pour effectuer des tests *in vitro* et *in vivo*. Le rendement de l'extraction représente le volume de l'huile essentielle

recupérée (en ml) pour 100g d'échantillon (Jordan et *al.*, 2009). Afin de préparer les différentes concentrations l'huile essentielle est diluée avec de l'acétone à 70%.



Figure 12: Dispositif de l'extraction par hydrodistillation

#### I.4. MATERIEL FONGIQUE

Six isolats autochtones ont été retenus pour évaluer le pouvoir antifongique *in vitro*. Trois d'entre eux sont isolés à partir de plants infectés provenant de différentes régions. Il s'agit d'un plant de tomate entier prélevé d'un champ de culture présentant les symptômes de la fusariose; flétrissement et jaunissement des parties aériennes des plants. Le deuxième échantillon est constitué de plants de pomme de terre prélevé d'un champ de culture à Sayada par les ingénieurs du service régional de la protection des végétaux, la maladie diagnostiquée étant l'alternariose. Et enfin des feuilles de pomme de terre provenant d'un champ infecté à Boughirat présentant les symptômes caractéristiques du mildiou ; des tâches huileuses apparaissant sur la face supérieure des feuilles. C'est à partir de ces échantillons que trois agents pathogènes ont été isolés et purifiés. Les trois autres isolats nous ont été fournis par le laboratoire de protection des végétaux

de l'université de Mostaganem il s'agit de deux isolats de *Botrytis cinerea* et un isolat de *Fusarium oxysporum fs.radicis lycopersici*.

Et enfin une souche exotique, *Phytophthora parasitica* 721, fournie par le professeur Michel Ponchet responsable de l'équipe interactions plantes-oomycètes(IPO) du centre PACA Sophia-Agrobiotech INRA (France).

#### **I.4.1. Isolement**

Des fragments provenant des échantillons de plants et présentant les symptômes sont superficiellement désinfectés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium (Eau de Javel) à 2%, puis rincés trois fois à l'eau distillée stérile. Après leur séchage sur papier buvard stérile, les fragments de plants infectés par l'altarnariose et de fusariose sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (pomme de terre-dextrose-agar) additionné d'un antibiotique. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant cinq jours. Alors que ceux affectés par le mildiou, sont déposés sur un milieu à base de petits pois décrit par Hammi (2003), l'incubation est réalisée à 18°C. On procède à des repiquages successifs à partir des bordures des jeunes colonies jusqu'à purification totale des colonies. L'identification des isolats est effectuée en se basant sur leurs caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques.

#### **I.5. PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE**

Après préparation d'une série de dilution d'huile essentielle (0,1%, 0,2%, 0,4% et 0,8%), et de l'extrait polyphénolique (20%, 40%, 80% et l'extrait brut), un millilitre de chaque dilution est ajouté aseptiquement à 09 ml de milieu de culture PDA maintenu liquide à 45°C. Après solidification, chaque boîte est inoculée à l'aide d'un disque mycélien de 5mm de diamètre provenant du front de croissance des cultures âgées de deux semaines. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant sept jours pour les deux premiers isolats. A l'exception de l'isolat 3, les explants sont prélevés d'une culture âgée de quatre jours et cultivées sur un milieu de culture à base de pois, l'isolat est incubé à 18°C pendant quatre jours. Quatre répétitions par condition sont retenues.

## I.6. ACTION *IN VITRO* DES EXTRAITS SUR LES AGENTS PHYTOPATHOGENES

### I.6.1. Action sur la croissance mycélienne

Pour chaque espèce fongique et pour chaque concentration en extrait et en huile essentielle, le diamètre est mesuré selon deux directions perpendiculaires. L'inhibition de la croissance fongique est évaluée par le pourcentage de réduction de la croissance mycélienne, calculée pour chaque isolat selon la formule décrite par Doumbouya et *al.* (2012) :

$$Ti\% = [(Dt-D)/Dt] \times 100$$

Où:

Ti : taux d'inhibition de la croissance mycélienne.

Dt : diamètre moyenne de la croissance mycélienne (en mm) en absence de l'extrait.

D : diamètre moyenne de la croissance mycélienne en présence de l'extrait.

### I.6.2. Action sur la sporulation

Nous avons retenu pour ce test que les isolats ayant présenté un certain taux de résistance vis-à-vis les extraits lors du test effectué sur l'extension mycélienne. Pour chaque espèce trois rondelles de 5mm de diamètre prélevées de cultures âgées de 14 jours et ayant servi à la croissance mycélienne sont placées dans un tube à vis contenant 1ml d'eau distillée stérile. Les tubes sont agités au vortex pendant 30 secondes, ce qui permet le détachement des spores des conidiophores (Hassikou et *al.*, 2002). Le comptage du nombre total de spores est effectué à l'aide d'un hématimètre de type Malassez, à raison de trois comptages par suspension et par concentration pour les deux extraits de Thym testés. Les valeurs sont exprimées en nombre de spores par unité de volume (ml). Le pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs) par rapport au témoin, est calculé comme suit :

$$PIs = [(N0 - Nc) / N0] \times 100$$

Où :

PIs : pourcentage d'inhibition de la sporulation (%).

N0 : nombre de spores estimé chez le témoin.

Nc : nombre de spores estimé en présence de l'extrait.

### **I.6.3. Action directe sur des zoospores**

#### ***I.6.3.1. Préparation des zoospores***

Un explant de la souche *Phytophthora parasitica* 721 est prélevé d'une culture âgée d'une semaine, le fragment est transféré dans le milieu V8 liquide pour maintenir le mycélium dans le liquide. Dans le but de favoriser la production des zoospores, des parcelles de mycélium sont cultivées sur une eau gélosée, puis les zoospores sont repris dans l'eau distillée stérile. Une numération cellulaire est faite sur une hématimètre de type Malassez pour déterminer la concentration suite à une lecture microscopique.

#### ***I.6.3.2. Conduite de l'essai***

Des dilutions décimales ont été effectuées à partir de l'extrait pour atteindre les concentrations suivantes : 20%, 2%, 0,2%, 0,2% et 0%. Sur une lame recouverte de téflon hydrophobe, délimitant des puits dans lesquels se fait le test.

Dans chaque puits on a déposé 1µl du milieu de culture liquide V8, puis 1µl de chaque concentration de l'extrait est ajoutée séparément. Ensuite 1µl de la suspension sporale est ajoutée sur chaque préparation. Les doses finales de chaque préparation sur la lame sont : 6%, 0,6%, 0,06%, 0,006% et 0% comme témoin. Une lecture sous un microscope photonique (Azioskop, zeiss) est effectuée immédiatement, deux heures et 48 heures après la mise en contact.

## **I.7. ACTION *IN VIVO* DES EXTRAITS SUR LES AGENTS PHYTOPATHOGENES**

Les semences de tomate, variété Saint-Pierre, ont été superficiellement désinfectées par un trempage dans de l'éthanol pendant deux minutes. Puis rincées abondamment à l'eau distillée stérile afin d'éliminer les résidus de pesticides utilisés en traitement de semences (Benhamou et al.1997).

### **I.7.1. La phytotoxicité des extraits**

Avant d'examiner l'efficacité des extraits *in vivo*, il nous a semblé nécessaire de vérifier l'innocuité des extraits vis à vis des plants de tomate. Pour cela deux lots de 12 plants chacun ont été utilisés. Ces plantules de tomates âgées de 20 jours ont été trempées dans des solutions de 0,1% et 0,2% d'huile essentielle pour le premier lot et de 20 % et 40 % en extrait polyphénolique pendant 20min pour le second. Pour les témoins, six plants ont été transférés dans des tubes ne contenant que la solution KNOP.

La phytotoxicité est estimée après 48h, par l'apparition d'un flétrissement et/ou jaunissement des plants traités.

D'autre part, nous nous sommes proposé d'évaluer l'effet des extraits de thym sur le taux de la germination des semences de tomate; des graines sont exposées aux substances volatiles des extraits de thym durant deux et quatre heures dans des récipients bien clos avant d'être déposées dans des boîtes de Pétri contenant deux couches de papier filtre stérile imbibé d'eau distillée stérile. Des graines non traitées sont utilisées pour constituer un lot témoin.

Les boîtes de Pétri, contenant chacune 20 graines, sont placées à l'obscurité dans une étuve à 25°C pendant 7 jours. De l'eau distillée stérile est ajoutée en cas de dessèchement du papier filtre. Deux répétitions sont prévues pour chaque lot.

Les boîtes de Pétri sont examinées tous les deux jours pour comptabiliser le nombre de graines ayant germé afin de calculer le pourcentage de germination. la germination est notée lorsque la radicule a émergé et est d'environ deux centimètres.

## **I.7.2. Evaluation de l'efficacité biofongicide**

### ***I.7.2.1. Traitement sur feuilles détachées***

Afin d'étudier *in vivo* l'efficacité antifongique des extraits de thym, un premier test est effectué sur des feuilles détachées. Pour cela, deux plants de tomates ont été traités par pulvérisation d'une solution d'extrait polyphénolique de thym diluée à 20%. Après 01h et 48h de l'application du traitement par pulvérisation, trois feuilles de chaque plant ont été détachées et transférées dans une boîte contenant un papier humidifié. On dépose par la suite une goutte d'une suspension contenant  $5 \times 10^2$  zoospores/ $\mu$ l de la souche *P. parasitica* 721. Trois feuilles prélevées d'un plant non traité sont également inoculées, et servent comme témoin.

### ***I.7.2.2. Traitement préventif sur semences***

Des semences de la tomate ont été traitées par exposition à la vapeur des extraits (huile essentielle et extrait polyphénolique) dans une boîte bien fermée, les durées d'application des traitements sont deux et quatre heures.

### ***I.7.2.3. Traitement préventif sur plantules***

Des plantules au stade de quatre feuilles ont été trempées dans des béciers contenant un volume convenable en huile essentielle à 0,1% (v:v), et 20% (v:v), 40% (v:v) en extrait polyphénolique, pendant 10min et 20min pour chaque concentration. Pour les témoins, des plantules ont été trempées dans des béciers contenant l'eau distillée stérile, et l'acétone à 70% séparément, pendant 10min et 20min. Juste après ces traitements, les plantules ont été transférées dans des tubes contenant la solution KNOP pendant 04 heures avant de les replanter dans le terreau. Le traitement est réalisé en trois répétitions pour chaque concentration et pour chaque durée de contact.

#### ***I.7.2.3.1. Inoculation de l'agent phytopathogène***

##### **A - Préparation des suspensions sporale :**

Après l'ajout de l'eau distillée stérile dans les boîtes de Pétri, les spores sont récoltées des cultures âgées de deux semaines pour les deux isolats FOL et *Botrytis*. La densité des suspensions sporales a été ajustée à  $10^6$  spores /ml à l'aide d'une cellule hématimétrique de type Malassez. (Mouaragadja et M'Batchi, 1998).

##### **B- Inoculation:**

Les plants ont été inoculés par trempage racinaire dans la suspension sporale de l'isolat *Fusarium oxysporum f.sp.Lycopersici* (FOL) pendant 30min. Pour le deuxième pathosystème Tomate/*Botrytis cinérea*, l'inoculation est faite par une pulvérisation foliaire de la suspension sporale de l'isolat. Par un suivi journalier, les résultats sont retenus après la destruction totale des témoins inoculés.

Pour chaque pathosystème, des témoins inoculés non traités et d'autres témoins sains sont réalisés. L'expérience est répétée deux fois pour valider les résultats.

## I.8. RESULTATS

### I.8.1. Rendements des extractions

Une quantité suffisante en l'huile essentielle est récupérée avec un taux de 1,3 %, la couleur allant du brun au brun-rouge (Fig.13) et une odeur aromatique très forte, phénolique (thymol). Quant à l'extrait polyphénolique (Fig.14), le rendement de l'extraction est aux alentours de 18%.



Figure 13 : Huile essentielle de thym récupérée par hydrodistillation.



Figure 14 : Extrait polyphénolique récupéré par extraction Soxhlet

### I.8.2. Identification des isolats

D'après les observations morphologiques, macroscopiques et microscopiques (Fig.15), trois isolats ont été identifiés, il s'agit de *Fusarium oxysporum* fs. *Lycopersici*, *Alternaria* sp. et *Phytophthora infestans*. Le tableau suivant présente les différentes caractéristiques morphologiques observées sur les trois isolats:

Tableau 5: Les caractéristiques morphologiques observées pour les trois isolats

	Symptômes	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Isolat
Is.01	Flétrissements et jaunissements des parties aériennes des plants.	Colonies à croissance duveteuse de couleur rose clair à rose violet	Présence de microconidies simple et des macroconidies cloisonnées. Le cloisonnement des macroconidies était entre 3 et 5.	<i>FOL</i>
Is.02	des tâches sur le feuillage sous forme de cercles concentriques, entourées souvent d'un halo jaune.	Colonies de couleur noir foncé, duveteuse et de forme concentrique, les cercles sont auréolés de blanc	Hyphes septés et ramifiés. Conidiophores sont bruns et cloisonnées, pluricellulaires de forme ovoïde avec une partie basale arrondie et une extrémité allongée.	<i>Alternaria</i> sp.
Is.03	Des tâches de formes irrégulières d'aspects huileux est observé sur les feuilles des plants atteints. La propagation de la maladie est très rapide	Les colonies poussent de façon radiale, compacte sans marge nette, elles sont duveteuses et présentent des courts hyphes aériens.	Les sporanges sont terminaux rarement intercalaires, caduques et portent un court pédicelle, ils ont une forme ovoïde. Les sporangiophores sont isolés ou organisés en bouquet. Le caractère morphologique principal est la présence de renflements au niveau des sites de ramification, en particulier aux points de la formation des sporocystes. Ces derniers en position terminale ont une forme souvent citronnée et possèdent une papille apicale.	<i>Phytophthora infestans</i>

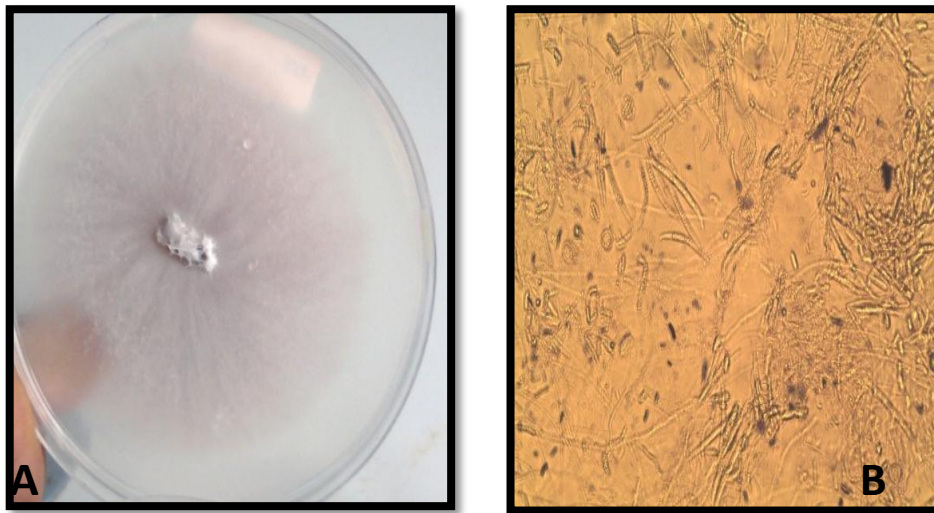
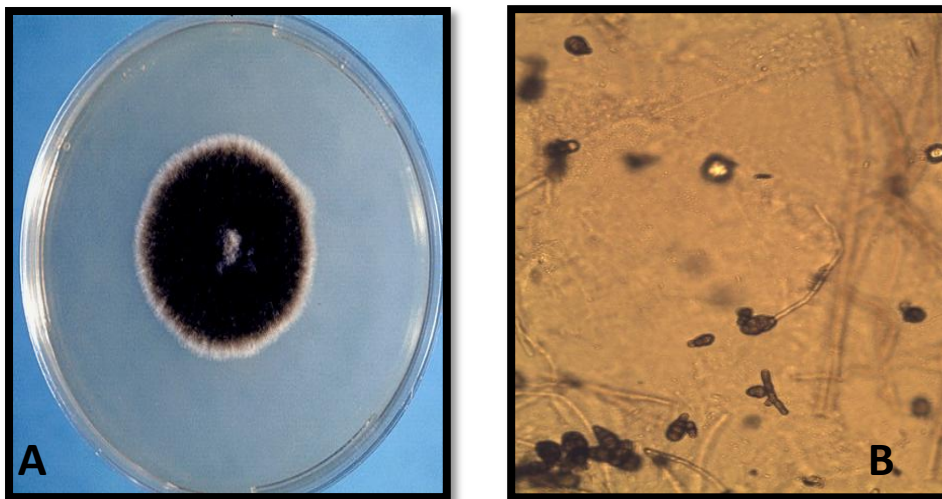
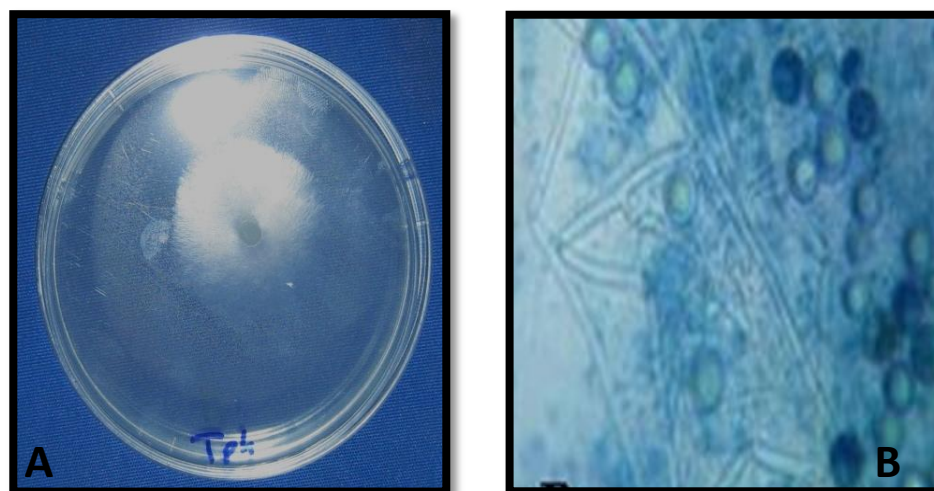
Is01 : *FOL*Is02 : *Alternaria* spIs03 : *Phytophthora infestans*

Figure 15: Aspects macroscopiques (A) et microscopiques (B) des isolats ; (Is01 : *FOL*, Is02 : *Alternaria* sp., Is03 : *Phytophthora infestans*)X40.

### I.8.3. Efficacité biofongicide par contact direct

En général, un pouvoir inhibiteur très important est observé sur la croissance mycélienne et la sporulation des isolats testés ( $p < 0,0001$ ) pour l'ensemble des concentrations appliquées ; ceci pour les deux extraits, huile essentielle et l'extrait polyphénolique.

#### I.8.3.1. Effet de l'huile essentielle sur la croissance mycélienne et la sporulation

L'analyse des résultats des tests antifongiques réalisés *in vitro*, montre une efficacité remarquable et hautement significative vis-à-vis des pathogènes étudiées (Fig.16A)

Une concentration en l'huile essentielle de l'ordre de 0,1%(v:v) à inhibée plus de 75% de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f.sp radicis lycopersici* (FORL), et 11% de l'extension mycélienne de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* (FOL). Le taux d'inhibition de ce dernier a atteint 73% sous l'effet d'une concentration de l'ordre de 0,2% (v:v), pour ces deux concentrations la sporulation a été bloquée entre 39% et 28,05% respectivement (Fig.16B).

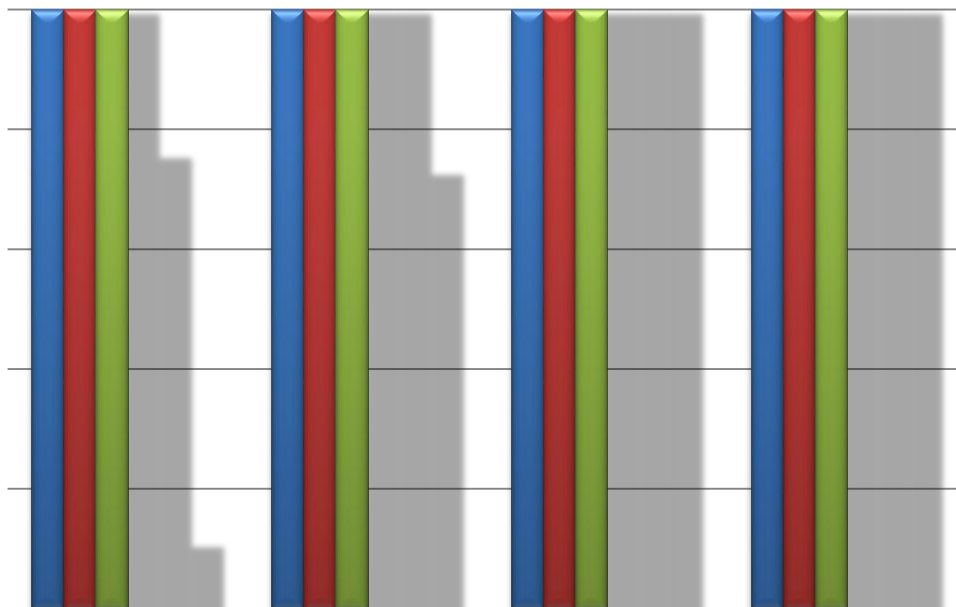


Figure 16A : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet de différentes concentrations en l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

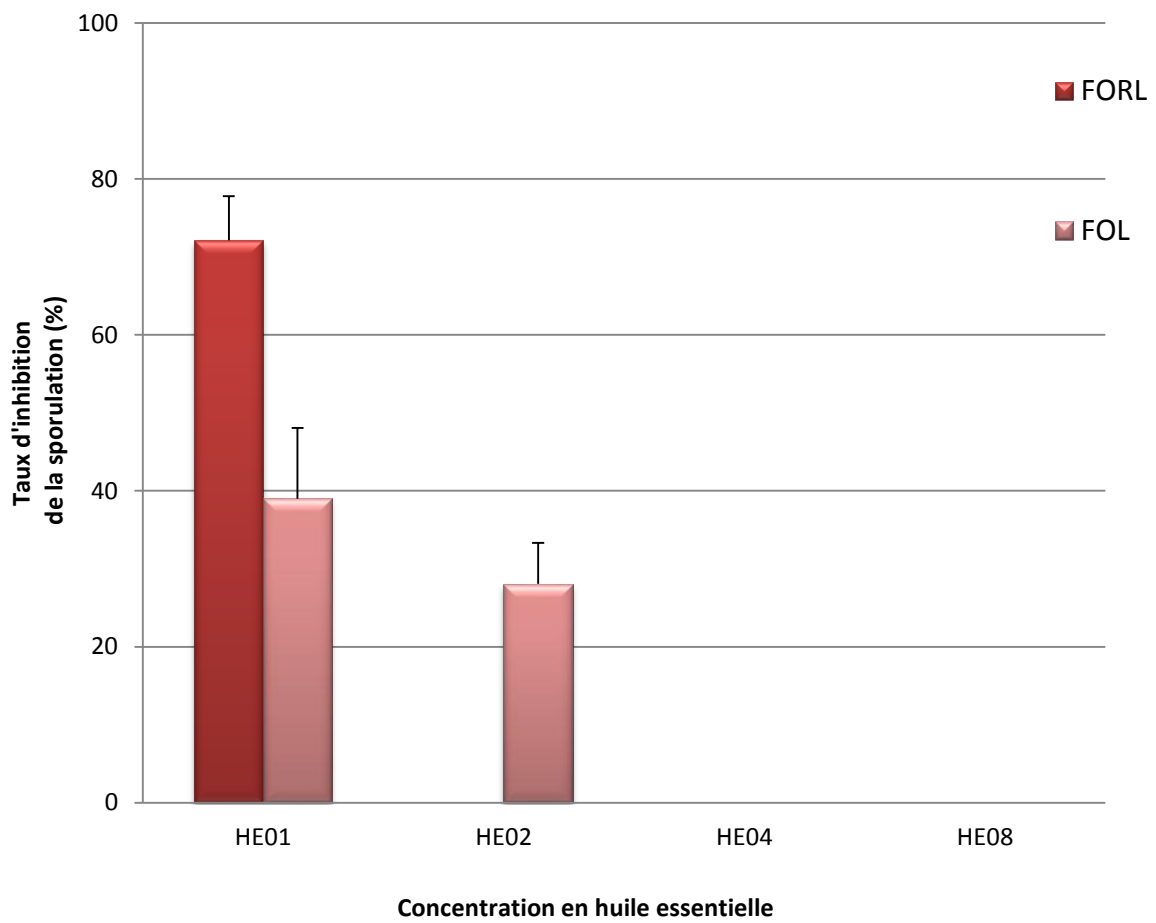


Figure 16B : taux d'inhibition de la sporulation sous l'effet de différentes concentrations en l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

*Phytophthora infestans*, *Alternaria sp* et les deux isolats de *Botrytis cinérea* ont montré une sensibilité très élevée vis-à-vis des différentes concentrations de l'huile essentielle de thym (figures 17,18).

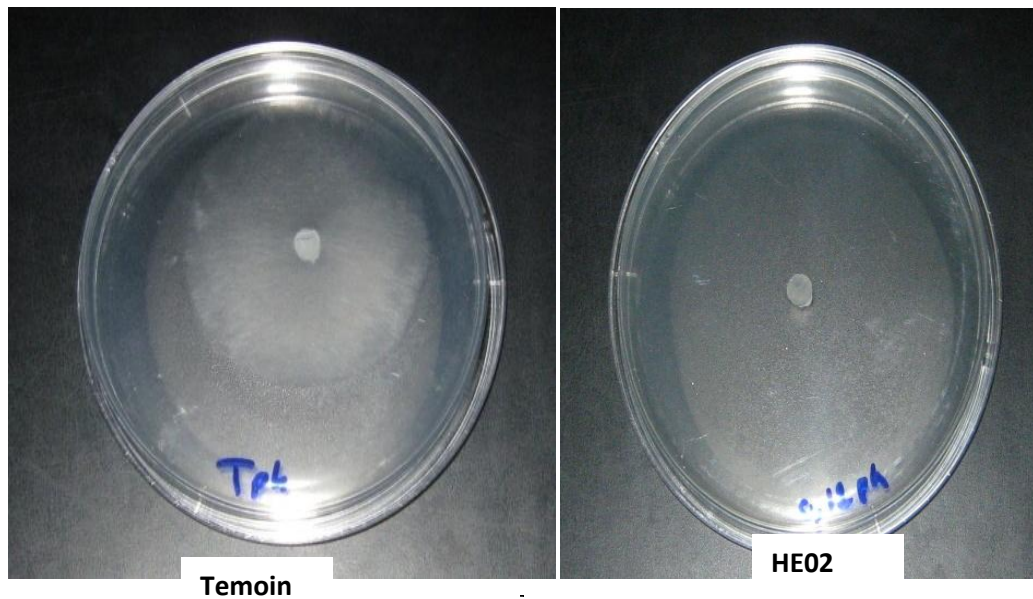


Figure 17: Inhibition totale de la croissance mycélienne de l'isolat *Phytophthora infestans* à HE02 de thym.

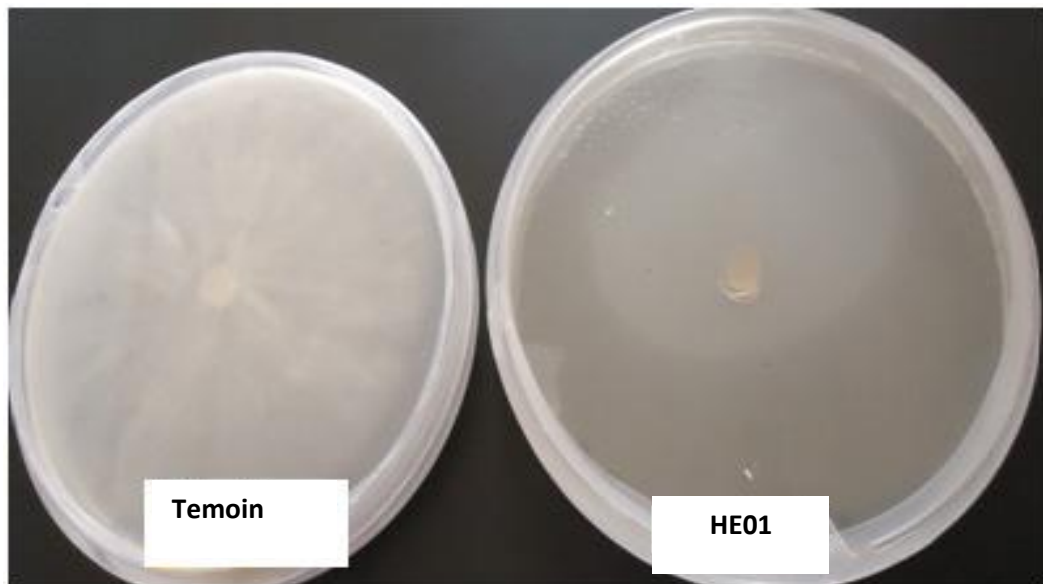


Figure 18: Inhibition totale de la croissance mycélienne de l'isolat *Botrytis cinerea* à HE01 de thym.

### 1.8.3.2. Effet de l'extrait polyphénolique sur la croissance mycélienne et la sporulation

Le taux d'inhibition augmente au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente pour l'ensemble des deux isolats de *Fusariums*, la concentration EPP20 a inhibé seulement 36,4% de la croissance mycélienne de FOL et de 82% à 40% de l'extrait (EPP40). Le blocage total n'est observé qu'à EPP80. D'après ces données l'isolat FOL a montré plus de résistance par rapport à l'ensemble des agents étudiés (Fig.19A).

*Phytophthora infestans* présente un haut degré de sensibilité vis-à-vis les différentes concentrations d'extraits, dont la plus faible concentration a inhibé totalement sa croissance mycélienne. De même pour *Botrytis cinérea* et *Alternaria sp*, l'extrait polyphénolique a donné le même résultat observé sous l'effet de différentes concentrations en l'huile essentielle de thym. L'inhibition totale est enregistrée quelle que soit la concentration appliquée.

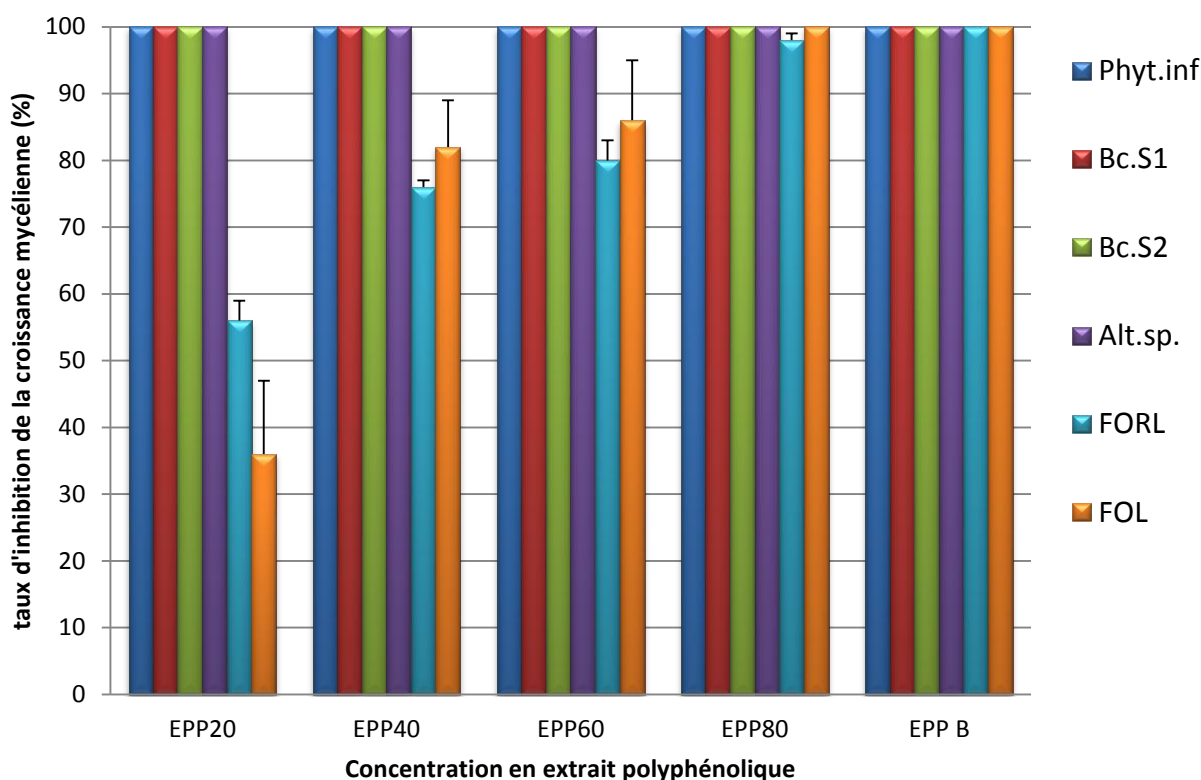


Figure 19A : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne sous l'effet de différentes concentrations en extrait polyphénolique de *Thymus vulgaris*.

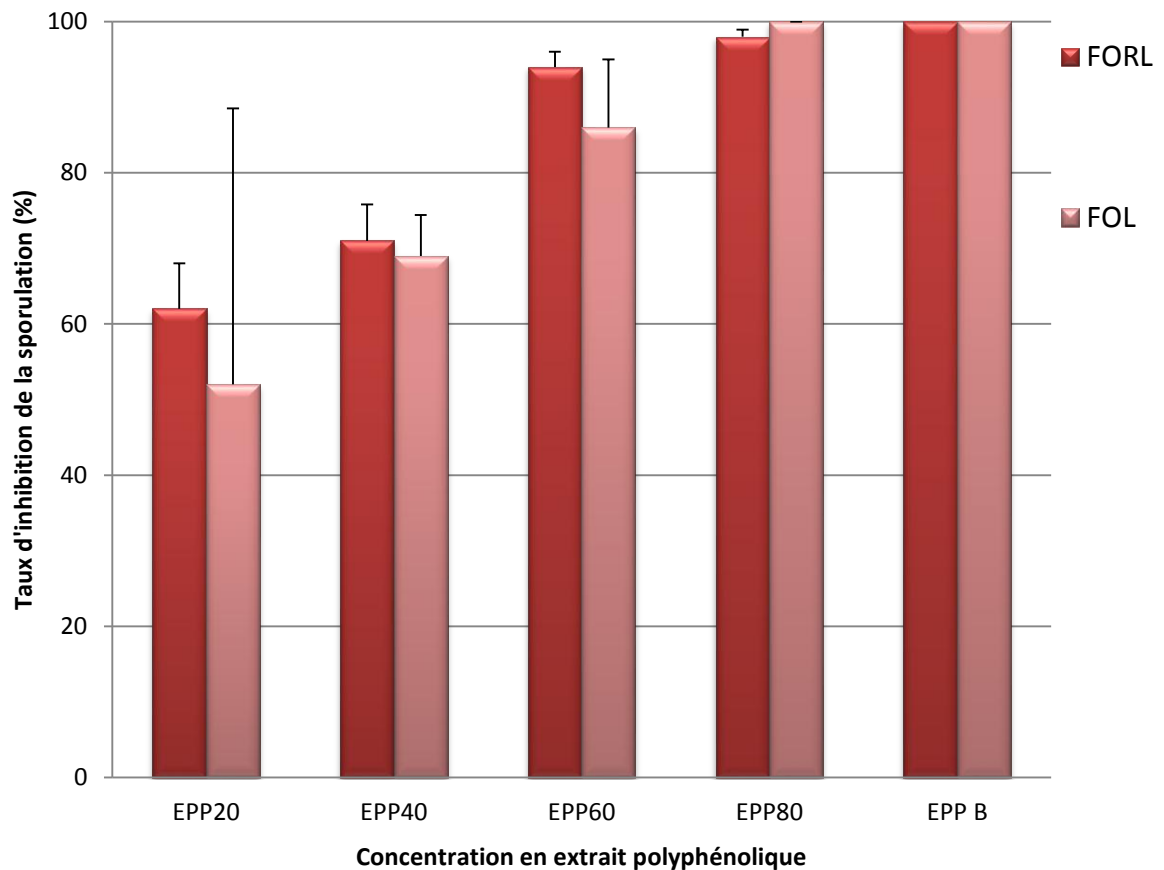


Figure 19B : Taux d'inhibition de la sporulation des deux isolats de *Fusariums* sous l'effet de différentes concentrations en extrait polyphénolique de *Thymus vulgaris*.

### ***I.8.3.3. Action directe sur des zoospores***

Afin de déterminer *in vitro* l'effet direct de l'extrait polyphénolique de thym à différentes concentrations une lecture est effectuée directement après la mise en contact. Pour cette première lecture, 6% et 0,6% en extrait provoquent une immobilisation immédiate des zoospores de la souche *Phytophthora parasitica* 721. Après 2h de mise en contact avec l'extrait, l'immobilisation atteint les zoospores exposées à 0,06% de l'extrait. L'observation microscopique effectuée après deux jours montre un développement mycélien dans l'ensemble des préparations sauf celle qui contient l'extrait polyphénolique à 6%.

#### I.8.4. Phytotoxicité des extraits

Les traitements appliqués sur plantules des tomates par trempage des racines dans l'extrait polyphénolique aux deux concentrations (20% v:v et 40% v:v) pendant 20 min, ainsi qu'une concentration de 0,1% (v:v) d'huile essentielle n'ont aucun effet toxique. En revanche 0,2%(v :v) d'huile essentielle exerce un effet phytotoxique témoigné par le flétrissement des jeunes plantes.

A noter, qu'aucun effet négatif n'est observé sur le taux de germination des semences de tomate. Contrairement aux résultats attendus, le traitement par exposition aux substances volatiles de l'huile essentielle pendant deux heures a augmenté le taux de germination de 22,22% par rapport au taux obtenu chez le groupe témoin (tableau 6).

Tableau 6: Taux de germination des semences de tomate cv Saint-Pierre exposées aux substances volatiles des extraits de thym.

Taux de germination/j	1 <sup>er</sup> jour	3 <sup>ème</sup> jour	14 <sup>ème</sup> jour
<b>Témoin</b>	0,00	44,44±7,86	75,00±3,93
<b>HE2h</b>	0,00	63,89±3,93	97,22± 3,93
<b>HE4h</b>	0,00	36,11±3,93	91,67± 3,93
<b>EPP2h</b>	0,00	50,00±7,86	88,89±15,71
<b>EPP4h</b>	0,00	38,89±7,86	88,89±7,86

#### I.8.5. Efficacité biofongicide *in vivo*

##### I.8.5.1. Effets sur feuilles détachées

Une diminution de taux d'infection est observée sur les feuilles provenant des plants traités 48h avant l'inoculation de l'agent phytopathogène, la réduction de la surface des lésions est de l'ordre de 80% en moyenne. Cependant, sur les feuilles détachées des plants traités une heure avant l'inoculation nous avons observé une réduction de plus de 50% en moyenne de tailles de lésions (Fig.20).

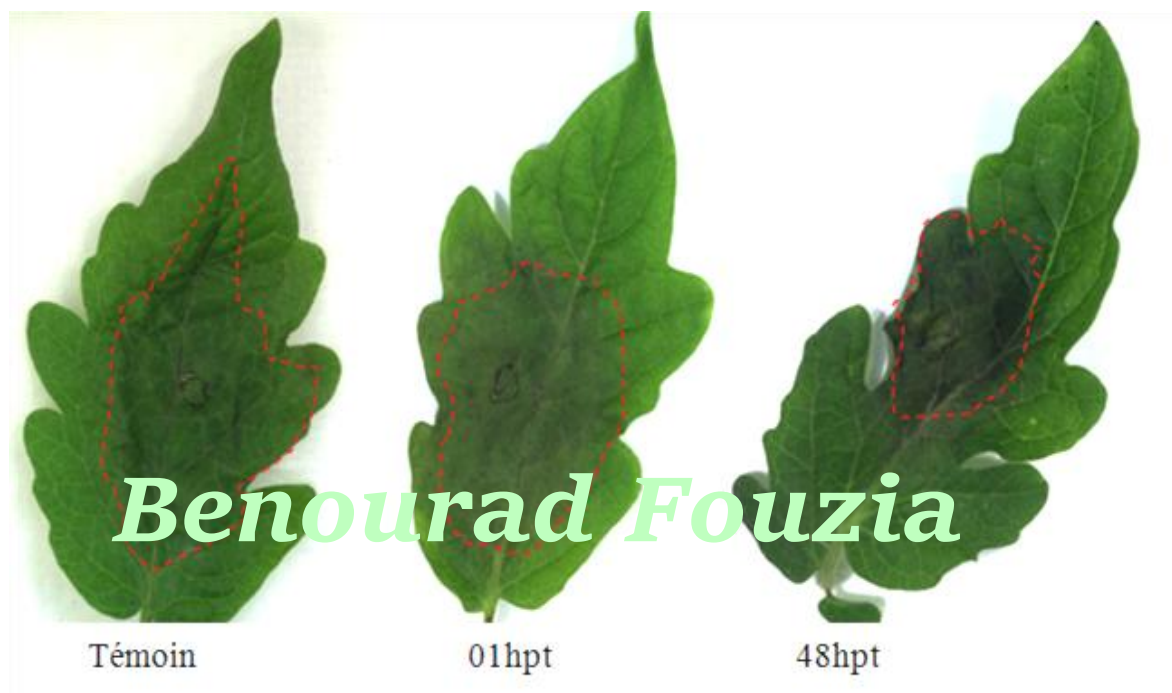


Figure 20: Résultats de traitement préventif appliqué par pulvérisation 48 heures post inoculation par *Phytophthora parasitica*721.

### ***1.8.5.2. Pathosystème Tomate/ FOL***

#### **1.8.5.2.1. Traitement des plantules**

Les figures (21 et 22) montrent l'efficacité du traitement préventif des extraits de thym ; l'huile essentielle et l'extrait polyphénolique. D'après les résultats obtenus 20 jours après l'inoculation de l'agent phytopathogène FOL, aucun signe de flétrissement ou de pourriture n'est observé. Les extraits présentent un pouvoir protecteur très puissant contre la fusariose (Fig.19), dont toutes les plantes traitées pendant 10 et 20 min par trempage racinaire présentent des taux de résistance très élevés. L'agressivité de la souche n'est observée que chez les témoins (plantules non traitées et plantules traitées avec l'acétone diluée à 70%).



Figure 21 : Plantules de tomates traitées préventivement par voie racinaire et inoculées par l'agent de la fusariose FOL (**20''EP50%** : traité 20 min par l'extrait polyphénolique dilué à 50% ; **10''EP50%** : traité 10 min par l'extrait polyphénolique dilué à 50% ; **20''EP20%** : traité 20 min par l'extrait polyphénolique dilué à 20% ; **10''EP20%** : traité 10 min par l'extrait polyphénolique dilué à 20% ; **20''HE0,1%** : traité 20 min par l'huile essentielle diluée à 0,1% ; **10''HE0,1** : traité 10 min par l'huile essentielle diluée à 0,1% ; **20''Ac70%** : traité 20 min par l'acétone diluée à 70% ; **10''Ac70%** : traité 20 min par l'acétone diluée à 70% ; **Témoins** : traité à l'eau stérile).

#### I.8.5.2.2. Traitement de semences

Ce mode de traitement a donné une efficacité très appréciée de la résistance des plantules contre l'agent de la fusariose (Fig.20). Selon les résultats obtenus le traitement a un double effet, pouvoir protecteur contre la maladie et un pouvoir inattendu dans cette étude ; et c'est le développement des parties aériens et souterrain des plantules issus de semences exposées aux substances volatiles des extraits de thym.

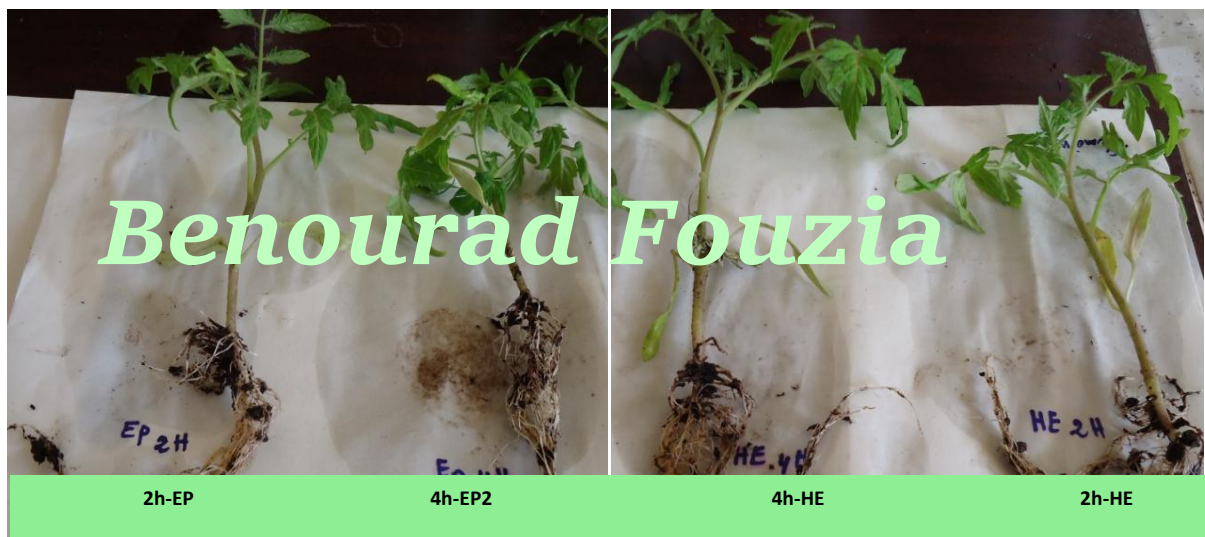


Figure 22 : Plantules de tomates issues de semences traitées et inoculées par l'agent de la fusariose FOL (**2h-EP** : traité 2h par exposition aux substances volatiles de l'extrait polyphénolique ; **4h-EP2** : traité 4h par exposition aux substances volatiles de l'extrait polyphénolique ; **4h-HE** : traité 2h par exposition aux substances volatiles de l'huile essentielle ; **2h-HE** : traité 2h par exposition aux substances volatiles de l'huile essentielle).

### ***I.8.5.3. Pathosystème tomate/pourriture grise***

#### ***I.8.5.3. 1. Traitement des plantules***

Les deux extraits ; huile essentielle et extrait polyphénolique aux doses appliquées montrent une capacité très élevée à protéger les plants de tomate contre la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. Les plantules traitées par l'extrait polyphénolique sont plus au moins plus développées par rapport aux plants traités par l'huile essentielle, ce qui reflète un potentiel protecteur plus élevé (Fig.23).

#### ***I.8.5.3. 2. Traitement de semences***

Les plantules issues des semences exposées aux substances volatiles des extraits de thym montrent un état de résistance semblable aux plantules traitées par trempage racinaire (Fig.24).



Figure23 : Plantules de tomates traitées préventivement par voie racinaire et inoculées par l'agent de la pourriture grise *Botrytis cinerea*(**20''EP50%** : traité 20 min par l'extrait polyphénolique dilué à 50% ; **10''EP50%** : traité 10 min par l'extrait polyphénolique dilué à 50% ; **20''EP20%** : traité 20 min par l'extrait polyphénolique dilué à 20% ; **10''EP20%** : traité 10 min par l'extrait polyphénolique dilué à 20% ; **20''HE0,1%** : traité 20 min par l'huile essentielle diluée à 0,1% ; **10''HE0,1** : traité 10 min par l'huile essentielle diluée à 0,1% ; **20''Ac70%** : traité 20 min par l'acétone diluée à 70% ; **10''Ac70%** : traité 20 min par l'acétone diluée à 70% ; **Témoin** : traité à l'eau stérile).



Figure24 : Plantules de tomates issues de semences traitées et inoculées par l'agent de la pourriture grise *Botrytis Cinérea* (**2h-EP** : traité 2h par exposition aux substances volatiles de l'extrait polyphénolique ; **4h-EP2** : traité 4h par exposition aux substances volatiles de l'extrait polyphénolique ; **4h-HE** : traité 2h par exposition aux substances volatiles de l'huile essentielle ; **2h-HE** : traité 2h par exposition aux substances volatiles de l'huile essentielle).

## I.9. DISCUSSION

### I.9.1. Efficacité biofongicide *in vitro*

Dans cette étude, l'activité biofongicide de deux extraits de *Thymus vulgaris* L ; l'huile essentielle et l'extrait polyphénolique a été évaluée *in vitro* sur six isolats phytopathogènes autochtones. En général, l'ensemble des résultats montre l'efficacité des extraits aux doses choisies, appliquées par contact direct.

HE01 a inhibé totalement *Botrytis cinérea*, *phytophthora infestans* et *Alternaria* spp. Ce haut pouvoir fongicide peut être expliqué par la nature phytochimique des extraits; la présence de plusieurs molécules biologiquement actives dans le même extrait est probablement la raison pour laquelle les souches étudiées ont montré une sensibilité très importante vis-à-vis des différentes concentrations. Il est difficile pour les agents pathogènes de développer une résistance à un tel mélange de composants avec, apparemment, différents mécanismes d'action. (Mohammadi et al., 2012)

Néanmoins, les deux agents telluriques FOL et FORL présentent un certain taux de résistance vis-à-vis des plus faibles concentrations, le taux d'inhibition du développement mycélien de la souche FOL n'est que de l'ordre de  $11,08 \pm 05,00\%$  pour la dose HE01. Par comparaison avec les travaux de Nguetack et al. (2004), cette l'huile essentielle a réduit de 81% la croissance de *Fusarium* spp à 200 ppm ; une concentration très élevée par comparaison avec les concentrations choisies dans cette étude. Pattnaik et al., (1996), expliquent la variabilité des résultats par l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les micro-organismes testés et les huiles essentielles utilisées.

Cette sensibilité des isolats vis-à-vis des différentes doses appliquées est due à la présence des composés phénoliques (Vagelas et al., 2007), des substances bioactives comme le thymol et/où l'effet synergique de différents constituants de l'extrait. D'après Stahl-Biskup et Saez, 2002. In : EL-Bouzidi et al., 2013, la majorité des huiles essentielles extraites de *Thymus* sont caractérisés par leur contenu riche en monoterpènes, en particulier les deux composés phénoliques isomères thymol et carvacrol, aussi par une série d'autres composés plus ou moins actifs biologiquement, y compris l'eugénol, p-cymène,  $\alpha$ -terpinène, le linalol, géraniol et bornéol. Des échantillons de *Thymus* avec des quantités élevées de carvacrol se sont avérées plus actives avec des valeurs MIC et MLC de 0,16 et 0.32 $\mu$ l/ml, respectivement (Gonçalves et al., 2010). Selon l'hypothèse d'Ahmed et al.(2011), ces composés lipophiles (thymol et carvacrol) pénètrent dans la cellule et ciblent la

voie de biosynthèse de l'ergostérol. En même temps, ils réagissent avec la membrane elle-même avec leur groupement hydroxyle réactif. La participation du groupe hydroxyle dans la formation de liaisons hydrogène et l'acidité de ces composés phénoliques peut fournir des explications. D'après Arras et *al.* (2001) les phénols terpéniques des huiles essentielles provoquent plusieurs dégâts tels que des perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries. Les huiles essentielles ont des propriétés marquées qui sont valorisées dans de nombreux domaines, notamment l'aromathérapie et la cosmétique, auxquels s'ajoute le biocontrôle des bio-agresseurs. (Regnault-Roger et *al.*, 2008)

Récemment, dans les travaux de Plodpai et *al.* (2013) effectués sur les extraits naturels de *Desmos chinensis*, il a été montré que ces extraits ont un effet sur la perméabilité des cellules fongiques par une interaction directe avec la membrane cellulaire. Un changement dans la perméabilité cellulaire aurait entraîné un déséquilibre de la pression osmotique intracellulaire, une rupture ultérieure des organites intracellulaires, la fuite du contenu cytoplasmique et finalement la mort cellulaire.

### **I.9.2. Tests de phytotoxicité**

D'une manière générale, la majorité des effets secondaires sont testés sur la germination et/ou la croissance des jeunes plantules car ces stades physiologiques correspondent à des phases de développement particulièrement sensibles (An et *al.*, 1997). Dans cette étude, la phytotoxicité est évaluée sur des jeunes plantules et des semences de tomate cv Saint-Pierre, par trempage racinaire et par exposition aux substances volatiles émises par les deux extraits.

Les résultats des tests effectués sur le taux de germination des semences montrent non seulement l'innocuité des molécules volatiles des extraits de thym mais également une augmentation des taux de germination chez le groupe traité deux heures par l'huile essentielle. Cependant, sur des jeunes plantules, le traitement par trempage des racines dans une solution à 0,2% en huile essentielle de thym pendant 20 min exerce un effet phytotoxique, ceci est observé 48h après l'application du traitement par un flétrissement des plantules et un jaunissement après quelques jours de plus. Par contre selon les travaux de Cueto-Wong et *al.* (2010), l'huile essentielle de l'origan à 0.5% exerce un effet antifongique sur des graines de tomate infestées. De plus, aucun effet indésirable n'a été observé sur la germination des graines traitées.

### I.9.3. Efficacité biofongicide *in vivo*

Il y a très peu de travaux consacrés à l'étude *in vivo* de l'efficacité des extraits naturels, quelques recherches ont montré que l'application des extraits en plein champ par pulvérisation foliaire n'a pas donné les mêmes résultats obtenus au laboratoire. Selon les investigations de Neuhiff et *al.* (2003), la baisse d'efficacité sur le terrain pourrait être due à la sensibilité aux rayonnements ultraviolets, la décomposition des substances sous l'action des microorganismes présents à la surface des feuilles ou des microorganismes phyllosphères, ainsi qu'à une résistance insuffisante aux précipitations (Krebs et *al.*, 2006). Partant de ce fait, nous avons choisi de traiter les jeunes plantules préventivement par trempage des racines, et par traitement de semences par exposition aux substances volatiles de l'huile essentielle et l'extrait polyphénolique. Les traitements réalisés montrent une efficacité très appréciée sur la tolérance des jeunes plantules contre les deux maladies tellurique et foliaire étudiées; la fusariose et la pourriture grise.

Une étude récente a montré que l'extrait de *Thymus vulgaris* était très actif contre les champignons phytopathogènes de tomates parmi les extraits de cinq plantes; *Lantana camara*, *Salvadora persica*, *Thymus vulgaris*, *Zingiber officinale* and *Ziziphus spina-christi*, dont l'efficacité est évaluée contre *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* and *Rhizoctonia sp.* Et que ses valeurs MIC et MFC étaient relativement les plus faibles (Al-Rahma et *al.*, 2013). D'autre part, selon les travaux de Krebs et *al.* (2006) des préparations à base des plantes ont été testées *in vivo* contre le mildiou de la pomme de terre, dont l'agent causal est *phytophthora infestans*, ont montré une efficacité remarquable et même ont donné des résultats semblables à ceux du Kocide DF (fongicide à base de cuivre).

En outre, les travaux de Lee et *al.* (2012) montrent que l'huile essentielle de girofle a un effet suppresseur du flétrissement bactérien de la tomate, démontrée par une réduction significative de la croissance de *Ralstonia solanacearum in vitro* et atténuation considérable de la gravité de la maladie *in vivo*, sans aucune phytotoxicité sur les plantules de tomates.

D'après ces résultats, les extraits de *Thymus vulgaris* L. ont manifesté une efficacité très importante, un effet direct sur l'inhibition de l'extension mycélienne et la germination des spores des agents phytopathogènes étudiés, et indirect, suite aux traitements préventifs appliqués sur des jeunes plantules et semences de tomate. Une protection totale contre la fusariose et de la pourriture grise est enregistrée par un contact direct par trempage racinaire dans des solutions diluées des extraits de Thym, et indirect par exposition aux composés volatiles. D'après Al-Rahmah et *al.* (2013), les extraits de *Thymus vulgaris* et *Zingiber officinale* peuvent être une alternative attractive

pour l'utilisation des produits naturels pour la lutte contre les agents phytopathogènes des tomates, remplaçant les fongicides chimiques. Selon Lateur (2002), un traitement à base des extraits naturels peut activer les mécanismes de défense chez la plante, tel que un renforcement des parois cellulaires à la suite de dépôts de callose ou de lignine ou bien synthèse de protéines de défense. Certains auteurs ont rapporté que les agents de lutte inducteurs de résistance ne devraient pas avoir une activité inhibitrice directe sur l'agent pathogène. Cependant, aujourd'hui ce concept est plus flexible, et divers composés considérés comme des inducteurs de résistance exercent également une action directe sur les agents pathogènes (Ciavareli Lucas et *al.*, 2012).

L'ensemble de ces résultats et nos observations nous ont conduit à lancer une autre partie, afin d'étudier l'effet stimulant de la résistance des plantes.

## CHAPITRE II

# Etude de la composition chimique et du pouvoir éliciteur de la défense naturelle de l'extrait polyphénolique de *Thymus vulgaris* L.

### II.1. OBJECTIF

Cette partie de travail vise à déterminer un éventuel pouvoir éliciteur des extraits de thym. L'analyse de l'effet stimulateur est effectuée sur l'induction de quelques gènes de défense suivant une analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT-PCR et l'analyse du profil polyphénolique et protéique des extraits de plants de tomate traités. En parallèle, une analyse de la composition chimique de l'extrait EPP est effectuée par une technique chromatographique HPLC-DAD, afin de révéler la présence d'une ou plusieurs molécules à action élicitrice.

### II.2. MATERIEL ET METHODES

#### II.2.1. Matériel végétal

Des plants de tomate variété Marmande de six semaines ont été fournis par Institut Sophia Agrobiotech du centre Provence-Alpes-côte d'azur (INRA), afin d'évaluer le pouvoir éliciteur de l'extrait polyphénolique de thym. La culture est effectuée dans une chambre climatisée, dont la température est de 24 à 25°C et une photopériode de 16h/8h (Fig.25).



Figure 25 : plants de tomates cv Marmande cultivés dans une chambre humide à une température de 25°C et une photopériode de 16h/8h.

## II.2.2. Détermination de la composition chimique

### II.2.2.1. Test préliminaire

Un millilitre de l'extrait polyphénolique de thym est utilisé pour le dosage chromatographique, l'Acétone utilisée pour la résolubilisation de l'extrait a été remplacé par le Méthanol après une évaporation rotative, le résidu est repris dans 800 $\mu$ l de Methanol et 200 $\mu$ L d'eau ; dans ces conditions l'échantillon est dilué à 20%. Ce dernier subit une sonication suivi d'une centrifugation (16,5 rcf) pendant 01 min. pour l'élimination des fractions lipidique et chlorophyllienne, l'échantillon passe à travers une colonne chromatographique de silice C18. A cette étape, l'échantillon est prêt pour une analyse HPLC.

Le dosage est effectué en utilisant une chaîne HPLC Shimadzu LC20AD dotée d'un détecteur UV-DAD (Diode Array Detector) et Fluo ex 305nm, em 407nm, et une colonne Inertsil 5 ODS-3 (IN5OD3-25QS) 250x4,6. (Colonne C18 FNR+LAV = 200mg, 4ml), le volume injecté est de 2 $\mu$ l. Pour l'éluion nous avons choisi un gradient de méthanol (annexe IV) et le débit est de 1ml/min.

### **II.2.2.2. Test de confirmation**

Le premier test effectué pour déterminer la composition chimique de l'extrait a révélé la présence de l'acide salicylique. Pour confirmer sa présence parmi les constituants, une extraction en phase solide (SPE : Solid Phase Extraction) est nécessaire ; le principe est simple : il s'agit de fixer le composé d'intérêt sur une phase stationnaire (C18) contenu dans une cartouche de la forme d'un corps de seringue puis on le récupère lors de l'élution. Afin de préparer la colonne avant l'analyse en faisant percoler un petit volume de méthanol pur, puis dilué à 20% contenant quelques gouttes du tampon acétate à 30% (pH 4,5 ; 100mM). Cette étape sert à donner un pH 4,5 dans la colonne; ce dernier favorise le passage de l'acide salicylique (charge négative) et la rétention des molécules hydrophobes.

Dans le cas où l'extrait contient l'acide salicylique la première fraction récupérée après l'injection de l'échantillon contient cette molécule, les constituants restants dans la colonne sont recueillis par des rinçages successives avec une solution contenant le méthanol, un tampon acétate et l'eau), suivi de trois rinçages avec le méthanol à 40%, 60%, et à 80%. Enfin les quatre fractions méthanoïques de l'extrait ainsi que la première fraction subissent une analyse HPLC.

### **II.2.3. Traitements des plants de tomates**

Les parties aériennes de deux plants de tomates sont pulvérisés par une solution diluée à 20% de l'extrait polyphénolique de thym. En parallèle, deux plants témoins sont pulvérisés par l'eau distillée. Après 24h et 48h de l'application du traitement, trois feuilles de chaque plant ont été détachées pour l'extraction de l'acide nucléique et les échantillons de 48 h pour l'extraction de métabolites secondaires. Les échantillons récoltés ont été enveloppés dans des feuilles d'Aluminium et maintenues dans l'azote liquide. Ces feuilles ont été réduites en poudre fine avant d'être utilisées.

Des échantillons de feuilles de tomates déjà traités par le  $\beta$  hydroxybutirique à 1mM (BABA) et l'acide salicylique à 1mM (Sigma-Aldrich) maintenus dans l'azote liquide, ont été fournis par le laboratoire, et qui servent comme contrôles positives.

## **II.2.4. Etude de l'élicitation de quelques gènes impliqués dans la défense :**

### ***II.2.4.1. Extraction de l'ARN***

Pour tous les étapes d'extraction et de préparation des échantillons d'extraits d'ARN nous avons suivi le protocole décrit dans les guides des kits que nous avons utilisés pour l'extraction (RNAZOL), la retrotranscription (iScript™) et l'amplification des gènes.

D'abord, 50 mg de chaque échantillon (traités et témoins) est transférés dans un tube contenant un millilitre d'une solution de RNAzol (Sigma-Aldrich); ce traitement est effectué dans le but d'éliminer les polysaccharides, les protéines et l'ADN. Ensuite, une solution de RNase free water (0,4 ml) est ajoutée, le mélange est centrifugé à 12,000xg pendant 15 min. Après prélèvement du surnageant, un volume équivalent de l'isopropanol est ajouté afin de précipiter l'ARN, laissant reposer pendant 10min et centrifuger pendant 10min à 12,000xg. Cette étape est suivie par deux rinçages du culot contenant les fractions d'ARN par l'ajout d'un volume de 0,6 ml d'éthanol à 75%, la solution récupérée subit une centrifugation à 8,000xg pendant 3min. Enfin, pour récupérer l'ARN ; 2µg/ml de RNase free water est ajouté au culot, puis vortex pendant 5 min afin d'homogénéiser la solution.

### ***II.2.4.2. La Rétrotranscription de l'échantillon d'ARN***

Etant donné que la quantité et la qualité d'ARN extraite conditionnent le rendement de la retrotranscription, ces derniers doivent être déterminés parfaitement. La qualité de l'ARN est définie par sa pureté, elle est déterminée par la mesure de l'absorbance à 230 (contaminants organiques) et 280 nm (spécifique des protéines), l'ARN étant considéré pur pour des ratios  $A_{260}/A_{230}$  et  $A_{260}/A_{280} > 1.8$ . Dans cette étude le spectrophotomètre NanoDrop® (NanoDrop 2000, Thermo, Scientifics) est utilisé, cet appareil ne nécessite qu'un microlitre d'échantillon, mis directement en contact avec le système optique.

Pour préparer les échantillons d'ARN, cinq microlitres d'une solution tampon DNASE buffer 10x (ambion®) est ajoutés à un microlitre de turbo DNase et 15µl de l'extrait d'ARNt. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30min dans un bain-marie (Bioblick). Ensuite cinq microlitres de l'activateur iScriptTcDNA (BIO-RAD, Laboratories, Inc.) est ajoutés avant de centrifuger le mélange à 10,000xg pour 1,5min.

La réaction se déroule dans le thermocycleur (GeneAmp, PCR system 9700). En premier lieu la température est de 25°C pour 05 min, elle augmente jusqu'à 42°C pendant 30min et en dernier lieu elle augmente encore plus jusqu'à 85°C pour 5min.

### **II.2.4.3. PCR en temps réel**

Nous avons utilisé l'approche de quantification des gènes par RT-PCR, la cinétique de quantification est basée sur la détection « en temps réel » du signal fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré au cours de l'amplification. C'est une technique qui couple la RT-PCR classique avec une technique de quantification fluorescente (Higuchi et al., 1993). Pour cela nous avons choisi quelques gènes impliqués dans les processus de défense naturelle des plantes.

Parmi les gènes de défense, nous avons retenu quatre gènes dont l'expression est généralement corrélée à un état d'élicitation ; deux gènes codant pour deux protéines PR1 P4 et PR1P6, un gène codant pour une glucanase (PR2) et le dernier codant pour une chitinase 4 (PR3).

Cette méthode permet de mesurer la quantité initiale en déterminant le nombre de cycles requis, ceci est corrélé fortement avec le nombre de copies de départ dont seule la phase exponentielle est représentative de ce nombre. Le résultat est normalisé par un gène de référence, dans cette étude nous avons choisi l'actine (un gène constitutif).

#### **- Quantification relative normalisée par un gène de référence**

En appliquant cette méthode, la différence d'efficacité peut être corrigée pour obtenir un résultat précis. Les calculs se font selon les formules suivantes :

$$\Delta Ct = Ct[\text{gène d'intérêt}] - Ct[\text{standard=actine}] = \text{gène d'intérêt corrigé}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct [\text{gène corrigé traité}] - \Delta Ct [\text{gène corrigé contrôle}]$$

Fold Change = Nombre de copies =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (aussi par la ratio traité/contrôle).

### II.2.5. Extraction des Métabolites secondaires

Après 48h de l'application du traitement, une extraction est effectuée pour déterminer s'il y avait une activation des voies de synthèse des composés phénoliques impliquées dans les stratégies de défense chez les plants de tomate. Ainsi un dosage de protéines est réalisé pour vérifier l'effet du traitement sur le taux des protéines PR « *protein's related pathogenesis* » produites. Pour ce test, des feuilles traitées avec le BABA qui ont été conservées dans l'azote liquide sont fournies par le laboratoire, ainsi que des feuilles non traitées sont utilisées et qui servent respectivement comme témoin positif et négatif.

#### II.2.5.1. Extraction des protéines

250 mg de la poudre (feuilles de tomate) est ajoutés à 1,5ml d'acétone pur, après 2 min le mélange est centrifugé à 12,000xg pendant 3min (4°C). Cette étape est répétée une fois après récupération du culot et après 7min de repos à une température ambiante. La troisième étape consiste à ajouter 1,5ml de l'acétone dilué à 50%. Après une centrifugation dans les mêmes conditions, 1,5ml de DTT (1mM) est ajouté au culot suivi par une homogénéisation par le vortex. Cette étape est suivie par une centrifugation dont on récupère le surnageant puis on ajoute 1,5ml de MES à 20mM (pH 6 ; 01mM DTT), afin de solubiliser davantage des protéines le mélange subit une sonication durant cinq minutes, encore une étape de centrifugation afin de récupérer la fraction MES. Ensuite, 1,5ml de TRIS à 40mM (pH 9,5 ; 01mM DTT) est ajouté, le mélange est centrifugé après 7min de repos. Après la récupération de la fraction Tris on ajoute le SDS 1%, et on centrifuge encore après un repos de 7min, et on récupère le surnageant qui représente la fraction SDS.

Deux gels de polyacrylamide sont préparés (annexe) et 5µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits des gels préparés. Après 30min de migration sous un champ électrique à 20 volt, et après la récupération des gels, plusieurs étapes sont nécessaires pour une coloration à l'argent, dont la première sert à fixer les protéines dans le solvant A (annexe) pendant 45min, suivie par trois rinçages de 15 min avec le solvant B. Après, les gels sont mis en contact pendant une minute dans le solvant C, suivi par trois rinçages intensifs à l'eau. Pour la dernière étape ; celle de la révélation les gels sont maintenus dans le solvant E jusqu'à ce que les bandes apparaissent, la réaction est stoppée par trois rinçages à l'eau et une fixation dans le solvant A.

### **II.5.2. Extraction des composés phénoliques**

Pour l'extraction des composés phénoliques, 250 mg de la poudre de chaque échantillon sont ajoutés à 1,5ml de l'acétone pur en laissant macérer durant 5min. Après, une centrifugation pendant une minute (16rcf) est effectuée, cette première étape est appliquée deux fois. Ensuite, un volume de 1,5ml d'acétone à 50% est additionné au culot et la centrifugation est faite après 5min de repos.

Pour chaque traitement, les trois fractions sont mélangées, additionnées d'un millilitre d'eau et un millilitre d'acétone à 80%. Dans ces mêmes conditions expérimentales un plant non traité a subi la même procédure d'extraction et qui servira comme contrôle.

En parallèle, quatre colonnes chromatographiques de silice C18 sont rincées par le méthanol à 100%, l'acétone à 100% et enfin par l'acétone à 80% avant d'être utilisées. Les extraits des plants traités ainsi qu'un extrait d'un plant contrôle sont passés dans la colonne afin d'éliminer les lipides et les fractions chlorophylliennes. Les extraits récupérés sont prêts pour une analyse HPLC.

## II.3. RESULTATS

### II.3.1. Identification de quelques constituants de l'extrait

D'après les résultats d'une analyse HPLC, à 300nm le chromatogramme de l'extrait présente plusieurs pics représentant la présence de composés flavonoïques comme l'apigénine et le naringénine sous formes libre et glycosilées, une forme acide d'un ester hydroxycinnamique que représente l'acide rosmarinique (Fig.26). Et un pic correspond au thymol est détecté à 254 nm (Fig.27).

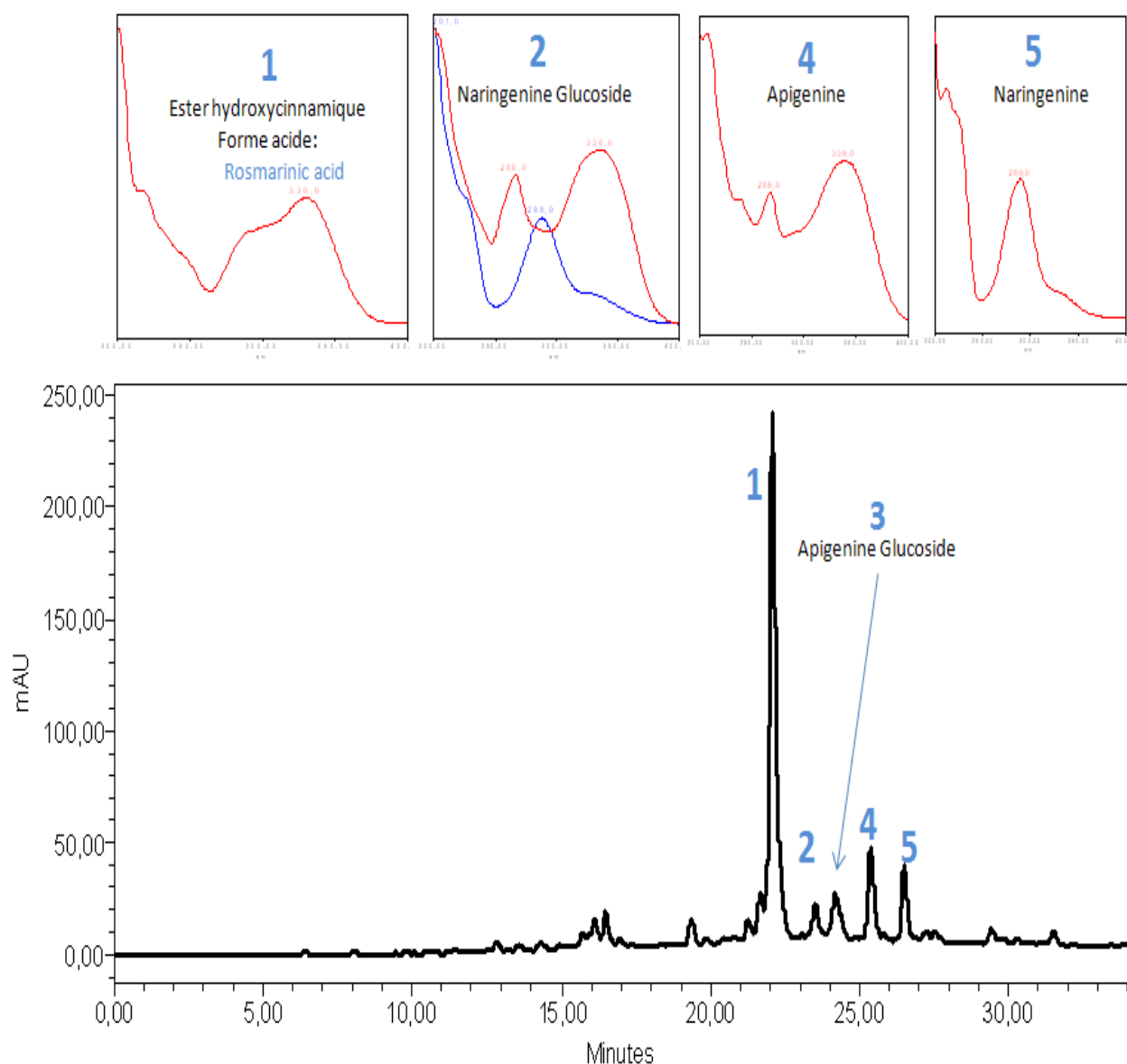


Figure 26 : Principaux flavonoïdes trouvés dans l'extrait polyphénolique du thym (chromatogramme HPLC à 300nm).

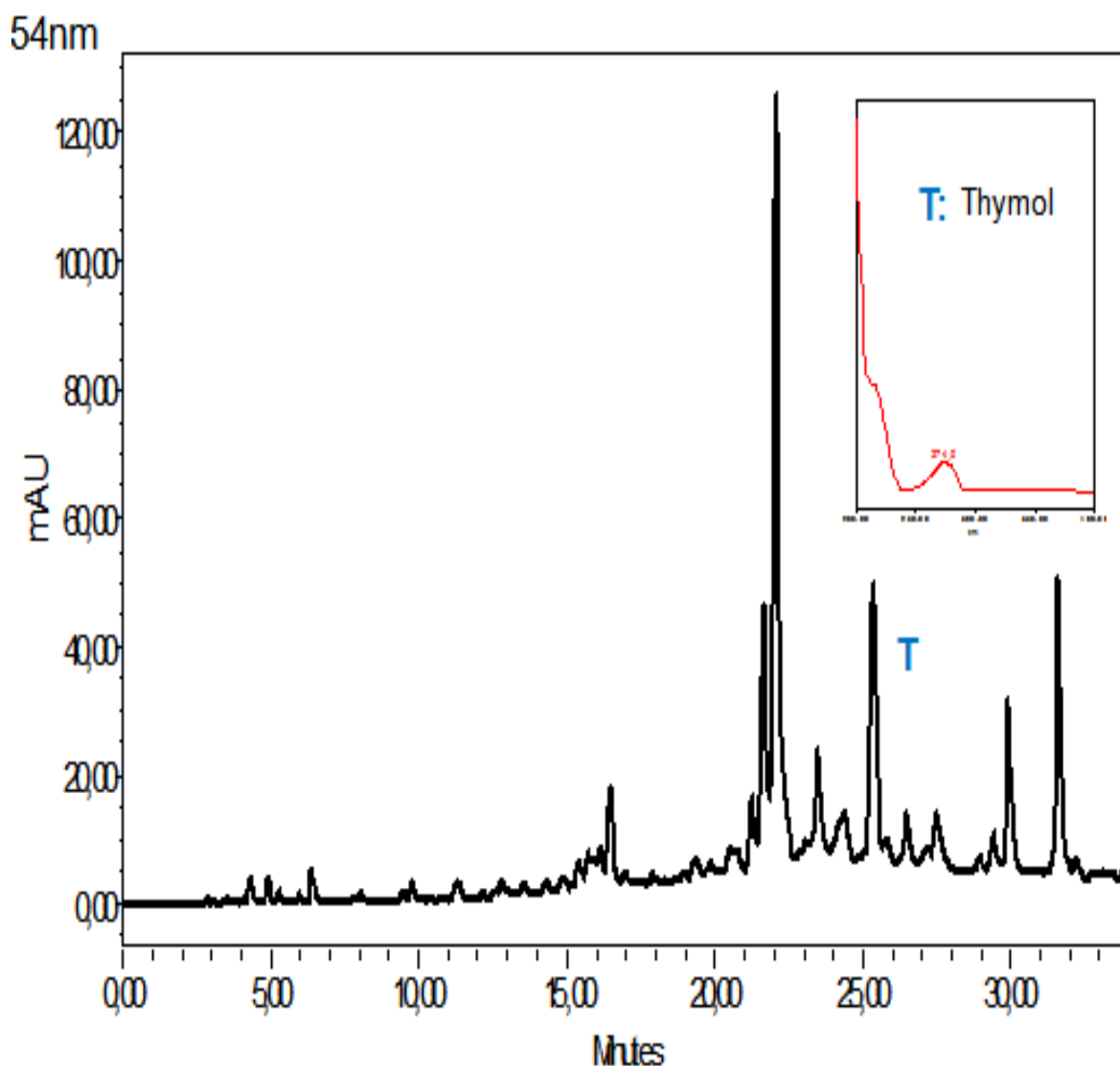


Figure 27 : Chromatogramme HPLC montre le pic qui correspond au thymol à 254nm.

Parmi les constituants détectés dans l'extrait de thym, un pic apparut à  $>300\text{nm}$  dont le spectre est similaire au spectre UV de l'acide salicylique, le test de confirmation réalisé dans l'intention d'affirmer sa présence après une purification de l'extrait pour l'isolement de cette molécule a confirmé qu'il s'agit bien de l'acide salicylique. D'après le résultat l'AS est présent dans l'extrait de thym à environ  $5\ \mu\text{g/ml}$  de l'extrait brut (Fig.28).

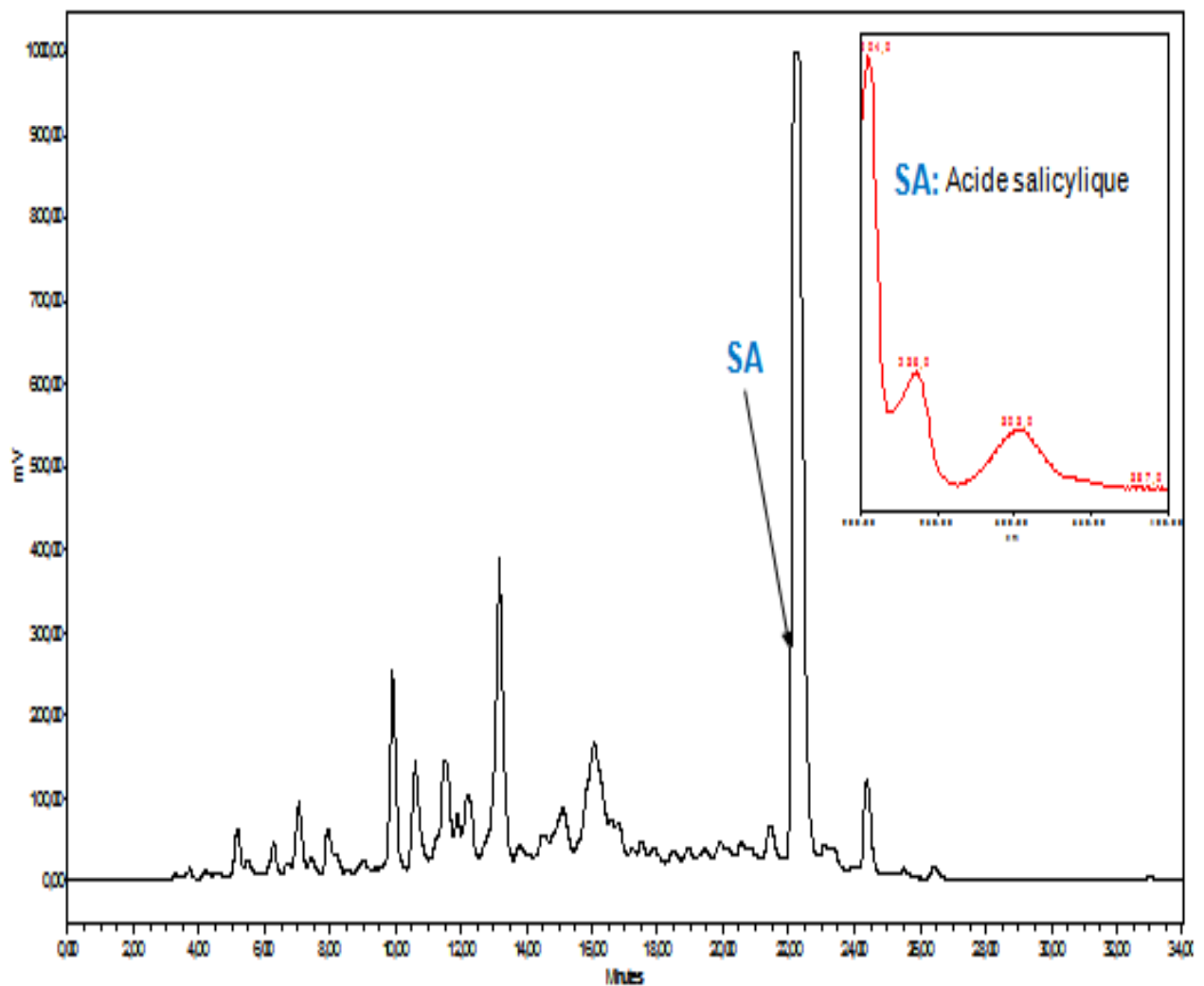


Figure 28 : Confirmation de la présence du spectre typique de l'acide salicylique dans l'extrait hydroalcoolique de thym.

## II.3.2. Gènes de défense induits par le traitement appliqué

### II.3.2.1. Expression des gènes de défense

L'expression de quatre gènes codants pour des protéines de défense a été étudiée à savoir le **PR1P4**, **PR1P6**, le **chitinase 4** et la **β-glucanase1**. La figure 29 montre le résultat de l'expression de ces quatre gènes 24h et 48h après traitement, d'après les résultats le traitement a induit l'expression du gène codant pour la protéine PR1P6 de  $124.79 \pm 104.31$  après 48h du traitement. Le gène codant pour la **chitinase 4** a été induit modérément par rapport à l'induction du gène codant pour la protéine **PR1P6**, dont l'induction est de l'ordre de  $50.34 \pm 70.18$ .

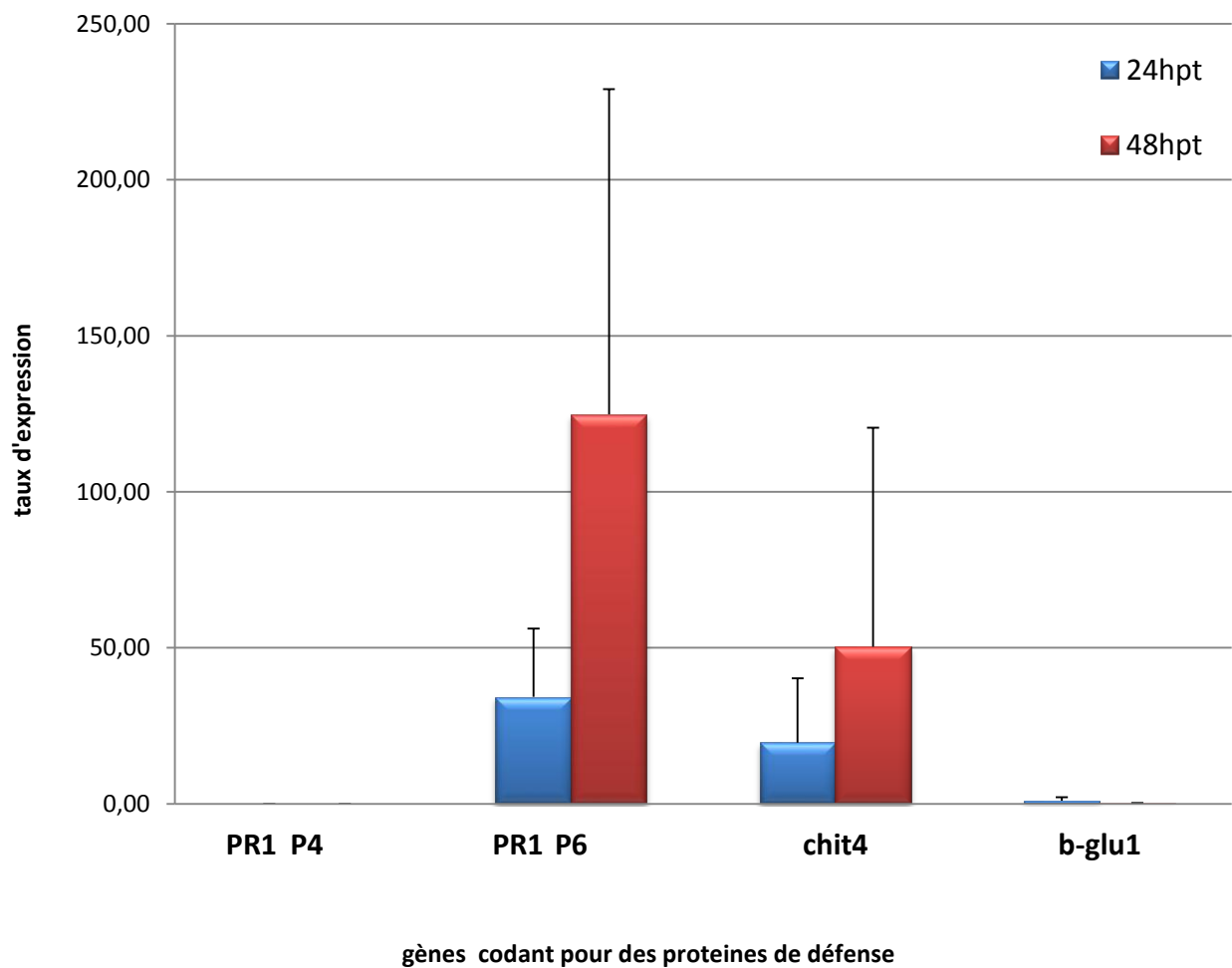


Figure 29: Expression des gènes de défense (**PR1P4**, **PR1P6**, la **chitinase 4** et la  **$\beta$ -glucanase1**) 24hpt et 48hpt par pulvérisation de l'extrait de thym sur plants de tomate cv Marmande.

### II.3.2.2. Synthèse des protéines de défense

L'électrophorèse des extraits des feuilles de tomate traitées par pulvérisation montre que le traitement n'a pas d'effet sur la production des protéines de défense. Les protéines PR représentent un ensemble de protéines produites par les végétaux dont la production est fortement induite lors de l'infection; l'observation du gel d'électrophorèse montre un résultat très semblable au témoin non traité (Fig.30). En revanche, par comparaison avec un contrôle traité par le BABA, plusieurs bandes sont apparues qui correspondent à des protéines de défense induites par le traitement appliqué. Contrairement aux résultats de l'expression du gène de cette protéine 24 et 48 heures après traitement, d'après les résultats la synthèse de la protéine chitinase n'a pas eu lieu.

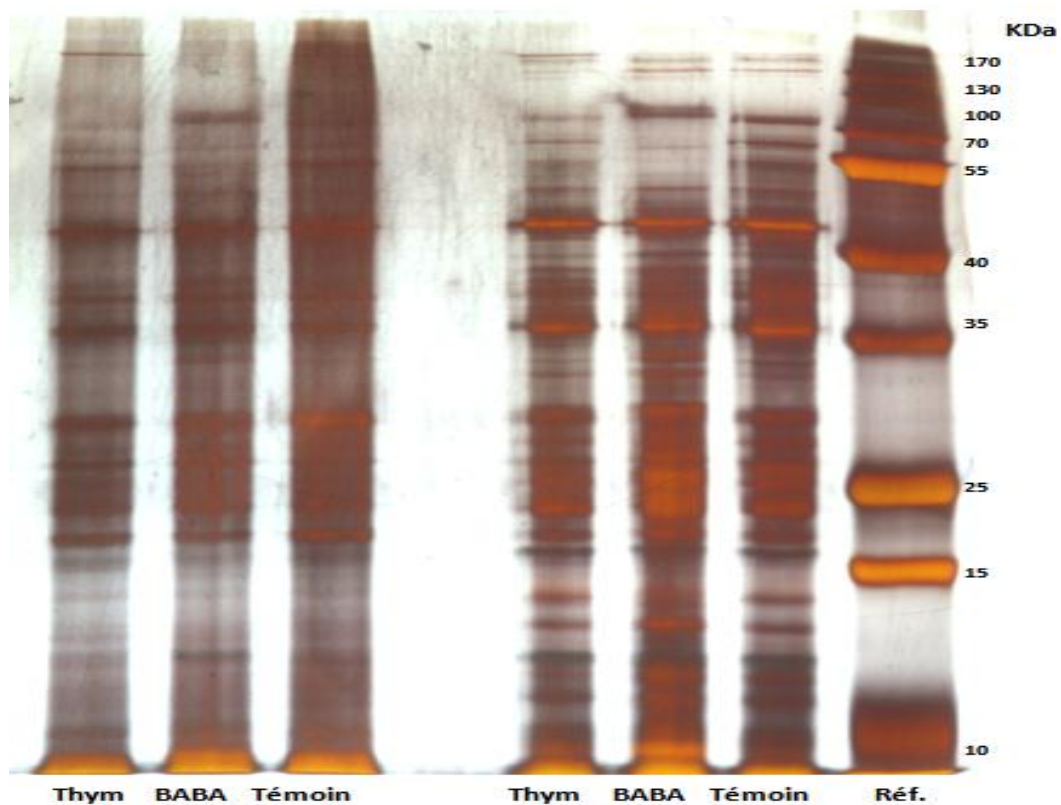


Figure 30: Electrophorèse des extraits de feuilles de tomate 48h après traitement par pulvérisation de l'extrait de thym et de BABA.

### II.3.2.3. Western blot

Le résultat du western blot montre la présence de la protéine PR1; une protéine de 14 KDa, produite chez les plantes suite à une attaque microbienne cette protéine est très connue par ces propriétés antifongiques. D'après ces résultats la protéine est bien présente dans l'extrait des feuilles de tomate 48h après traitement par l'extrait de thym et par l'acide salicylique (Fig.31). Ces résultats confirment les données montrées en dessus, qui présente l'induction du gène PR1P6 à presque 200 fois de plus.

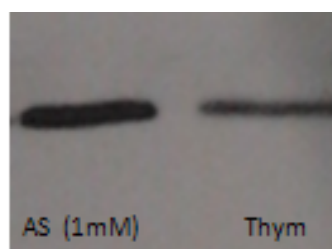


Figure 31: Western blot des extraits des feuilles de tomate 48h après traitement par pulvérisation à l'extrait de thym et l'acide salicylique.

### II.3.2.4. Extraits phénoliques des feuilles de tomate

La figure ci-après (Fig.32) présente les métabolites des extraits de feuilles de tomate 48h après l'application du traitement par pulvérisation de l'extrait de thym à 20%. D'après le chromatogramme, les pics représentent les métabolites ordinaires des extraits de feuilles de tomate. En plus, on remarque la présence de quelques pics qui représentent des métabolites déjà détectés dans l'extrait de thym.

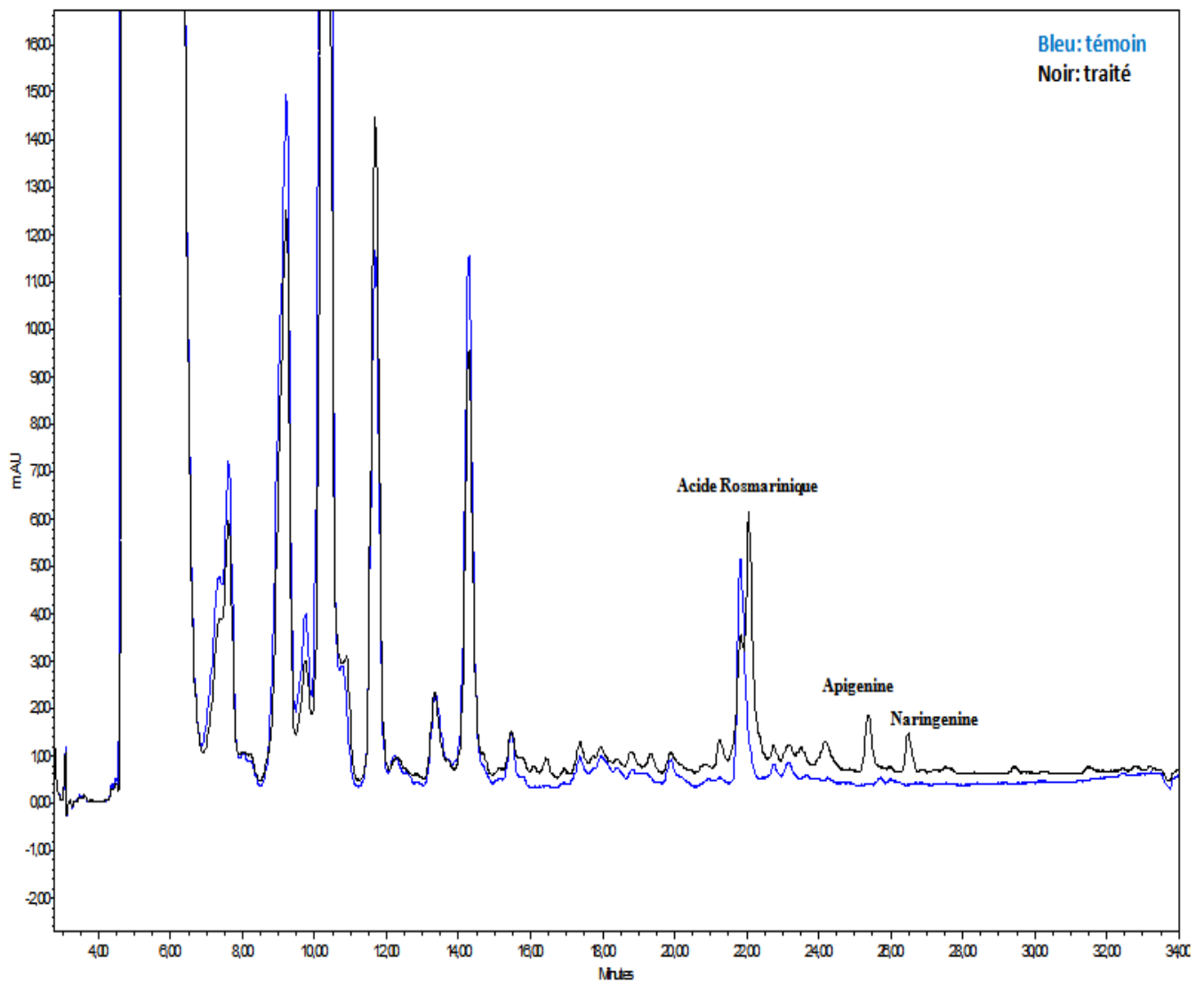


Figure 32: Extrait de métabolites de tomate traité par pulvérisation à l'extrait de thym.

## II.4. DISCUSSION

### II.4.1. Surexpression de gènes de défense et production des PR-protéines

Les plantes ont des gènes de défense qui ont besoin de stimuli ou de signaux appropriés pour être activés. Déclencher les mécanismes de défense par l'application d'un inducteur est une nouvelle technique pour la protection des végétaux (Manikandan et Sathiyabama, 2014).

Dans cette expérimentation l'analyse du profil protéinique révélé par SDS PAGE ne montre aucun changement vis-à-vis des extraits de feuilles traitées. Par contre, le western blot a dévoilé une surexpression de la protéine PR1 chez les plants traités par l'extrait de thym dilué à 20%. Plusieurs recherches indiquent une corrélation étroite entre l'expression de la PR1 et la résistance systémique induite (Alexander et *al.*, 1993 ; Tuner, 2009 ; Salgado-Siclán et *al.*, 2012)

D'après Jourdan et *al.* (2008), l'effet protecteur conféré par la SAR est phénotypiquement similaire à un autre phénomène, déclenché suite à l'interaction avec un microorganisme non pathogène, c'est l'immunisation de la plante.

Il est connu que les protéines de défense ont la propriété de résister à l'activité de protéases issues de la plante ou du pathogène. Les chitinases et les glucanase, par exemple, sont des glycoside-hydrolases capables de dégrader la paroi des champignons et des bactéries. Selon nos résultats, d'un point de vue moléculaire l'induction d'une surexpression de la chitinase 4 est bien mise en évidence. Cependant, contemplons les résultats d'analyse des extraits de feuilles de tomate traitées 48h après traitement, la synthèse de ces enzymes n'a pas eu lieu. D'après les travaux de Manikandan et Sathiyabama (2014) l'activité de deux isoformes de la chitinase ont été induites remarquablement dans l'extrait de feuilles traitées avec SA à 10 et 20 jours après le traitement. Ceci conduit à deux hypothèses, soit il s'agit d'un état de mise en alerte « priming » ou la synthèse de ces protéines aura lieu plusieurs jours après le traitement.

Même pour les peroxydases, sur le gel d'électrophorèse aucune couche protéinique n'est apparue dans les alentours de 40Kda et qui correspond aux peroxydases, donc aucun effet n'est observé 48h après traitement sur les extraits de feuilles traités. Ces enzymes interviennent dans le processus de l'insolubilisations des protéines et des composés phénolique, permettant une accumulation dans la paroi cellulaire et donc son renforcement (Pajot et Regnault-Roger, 2008)

#### II.4.2. Production des métabolites secondaires de nature phénolique

Selon Wydra et Beri (2006), une étude sur la comparaison de la composition pariétale des vaisseaux conducteurs de cultivars résistants et sensibles de tomate a permis d'établir une relation claire entre ce paramètre et le degré de résistance. Plusieurs travaux ont confirmé l'effet indirect de certains traitements sur le renforcement des parois, un mécanisme répandu de renforcement pariétal s'opère par des dépôts de composés spécifiques. Ces derniers peuvent être de nature polysaccharidique comme pour la callose, mais ils sont majoritairement phénoliques comme la lignine ou la subérine (Hoefle et Huckelhoven, 2008).

Dans cette étude, l'analyse HPLC des extraits de feuilles de tomate traitées par l'extrait de thym (20%) montre l'apparition de plusieurs pics correspondant aux substances déjà présentes dans l'extrait de thym. Dans un premier temps, on peut dire que ce sont des molécules restantes adhérentes à la surface des feuilles après traitement ; comme il s'agit d'un traitement appliqué par pulvérisation sur la partie foliaire de plants. Ou qu'il s'agit des molécules de l'extrait qui ont traversé la paroi et parvient à l'intérieur des plants. Ceci peut être expliqué autrement, prenons en considération l'effet potentialisateur ou priming de certains éliciteurs ; c'est un processus physiologique par lequel une plante se prépare à répondre plus rapidement ou de manière agressive pour des futures stress biotiques ou abiotiques (Frost et *al.*, 2008). Il été rapporté par Benhamou et *al.* (1996), que ce phénomène (potentialisation = priming) apparaît chez le pois traité par *B. pumilus* SE34, où un dépôt rapide de callose et de matériel phénolique sur les parois au niveau du site de pénétration n'est observé qu'après l'ajout du pathogène *F. oxysporum*.

Il est toutefois important de distinguer entre éliciteurs chimiques qui activent directement les réactions de défenses des plantes et des éliciteurs de potentialisation ou la mise en alerte qui réduisent le temps de réponse de la plante ou qui accroissent l'ampleur de la réponse de la défense tout en exigeant un autre signal pour déclencher la réponse complète de la défense (Paré et *al.*, 2005). Ceci est expliqué par certains chercheurs par une des stratégies d'économisation de l'énergie. Ce mécanisme permet à la plante de se « préparer » à une infection future sans pour autant engendrer d'investissements lourds au niveau des ressources métaboliques et énergétiques (au détriment des processus cellulaires fondamentaux) alors qu'aucune agression ne doit encore être combattue (Van Hulst et *al.*, 2006).

Il a été rapporté par Jourdan et *al.* (2008), que dans le contexte des réactions de défense systémiques, l'interaction avec le microorganisme inducteur ne mène pas toujours directement au renforcement du végétal. Un concept basé sur la mise en alerte des plantes ou potentialisation (*priming*) semble s'être généralisé. Cet état induit n'est pas très perceptible d'un point de vue

moléculaire tant que l'agression par le pathogène n'est pas ressentie. Le priming est basé sur la régulation positive des gènes liés à la défense ou d'autres métabolites qui peuvent initier la transduction du signal biochimique conduisant à un état de potentialisation (Conrath et *al.*, 2006).

#### **II.4.3. Composition de l'extrait de thym et l'induction de la défense**

Dans cette étude, une analyse préliminaire de la composition a été faite visant la recherche de la présence éventuelle d'un composant connu par ses propriétés inductrices de la résistance chez les plantes. Effectivement, la composition montre la présence d'un composant majoritaire « thymol » très étudié pour ses activités biologiques, en raison de ses actions acaricide, bactéricide et fongicide (Bruneton, 1999 ; Ettayebi et *al.*, 2000 ; Chun et *al.*, 2005 ; Bouhdid et *al.*, 2006). D'autres composants de nature flavonoïque sont identifiés, également connus comme biologiquement actifs.

Le plus substantiel est la présence du pic correspondant au signal de l'acide salicylique ; une molécule de nature phénolique très connue comme molécule signal dans les processus de défense chez les végétaux. C'est ce qui nous amène à comprendre les résultats de l'expression de gènes et du profil protéique des extraits de feuilles traitées par cet extrait. La surexpression de la protéine PR1 pour plus de 200 fois est le résultat d'une induction des voies de la résistance systémique induite par un apport exogène de l'AS entre autres. Selon la littérature, de nombreuses recherches ont été focalisées sur l'induction de la résistance systémique par l'AS (Colville et *al.*, 2008 ; Chen et *al.*, 2009 ; Noutoshi et *al.*, 2012 ; Manikandan et Sathiyabama, 2014).

Colville et *al.*, (2008) ont rapporté que le gène PR1 est utilisé pour surveiller un traitement par induction d'éliciteur et l'infection par le virus, est celui effectivement induit par SA et infection pathogène. AS est requis pour l'activation des réponses de défense au niveau local comme PR1 et va permettre la mise en place d'une résistance systémique acquise (SAR) (Tuner, 2009). Cela suggère un rôle de l'antigène dans la résistance via l'induction de la voie SA (Afroz et *al.*, 2009).

De même, les résultats de Chen et *al.* (2009) montrent l'implication de SA dans la défense de la tomate vis-à-vis de *R.Solanacearum* par l'analyse du silencing de NPR1 chez une lignée résistante, incapable de transmettre le signal SA. Le transformant présente une multiplication bactérienne plus importante qu'avec le sauvage et un plus grand nombre de plantes colonisées. Dans une étude récente, l'application foliaire de 0,1 mM de l' SA induit fortement la synthèse et l'accumulation de la chitinase, inhibiteur de protéase, une peroxydase, la polyphénol oxydase dans

les tissus de l'éleusine. Cela peut être attribué à la disponibilité des récepteurs spécifiques pour les inducteurs dans ces plants (Manikandan et Sathiyabama, 2014).

Plusieurs facteurs influent sur la réponse de plantes aux différents traitements chimiques ou éliciteurs naturels; comme la nature de l'agent inducteur, sa dose, l'espèce végétal, le cultivar et l'état physiologique.

Selon Tuner (2009) l'apport exogène de l'acide salicylique induit une accumulation de cette dernière.

## CHAPITRE III

# Evaluation prospective de la toxicité potentielle de doses répétées des extraits de *Thymus vulgaris* L.

Cette partie de travail vise à étudier la toxicité de deux extraits de thym par des méthodes classiques telles que la chimie clinique, l'histopathologie ainsi que par un outil plus innovant via une approche métabonomique ; pour avoir plus d'informations et comprendre les mécanismes cellulaires par lesquels le thym provoque des éventuels effets indésirables.

La métabonomique est l'étude du profil métabolique global, qui utilise des outils d'analyse à haute résolution et des analyses statistiques chimiométriques pour avoir une image intégrée du métabolisme endogène des xénobiotiques (Zhang *et al.*, 2012). La métabonomique identifie les signatures métaboliques reflétant les altérations biochimiques globales qui se produisent dans une maladie ou à la suite de l'exposition à une substance toxique (Duquesne *et al.*, 2012).

L'analyse spectroscopique  $^1\text{H}$ -RMN des liquides biologiques s'est avérée être l'une des techniques les plus puissantes pour étudier la réponse des organismes aux xénobiotiques (Shockcor et Holmes, 2002). Les données peuvent ensuite être exportées facilement dans un logiciel comme le SIMCA ou MATLAB pour une analyse multivariée, en utilisant des méthodes telles que la PCA et l'analyse discriminante des moindres carrés partiels (PLS - DA). PCA scores plots est un moyen rapide d'évaluer le regroupement des échantillons, les valeurs aberrantes et la séparation des classes, alors que les loading plots correspondants permettent de déterminer les variables (Want *et al.*, 2013).

### III.1. MATERIEL ET METHODES

#### III.1.1. Animaux

Des rats mâles Wistar Han pesant entre 200 et 300g (Janvier Elevage, France) ont été logés dans des cages métaboliques individuelles avec accès libre à la nourriture et à l'eau (Fig.33). Les conditions de l'environnement ont été fixées à une température de 25 °C avec une humidité relative de 50% et un cycle de lumière de 12 h (jour/nuit). Toutes les expérimentations animales ont été menées à l'Université de Mons (Belgique), en accord avec le comité local d'éthique de l'institution.

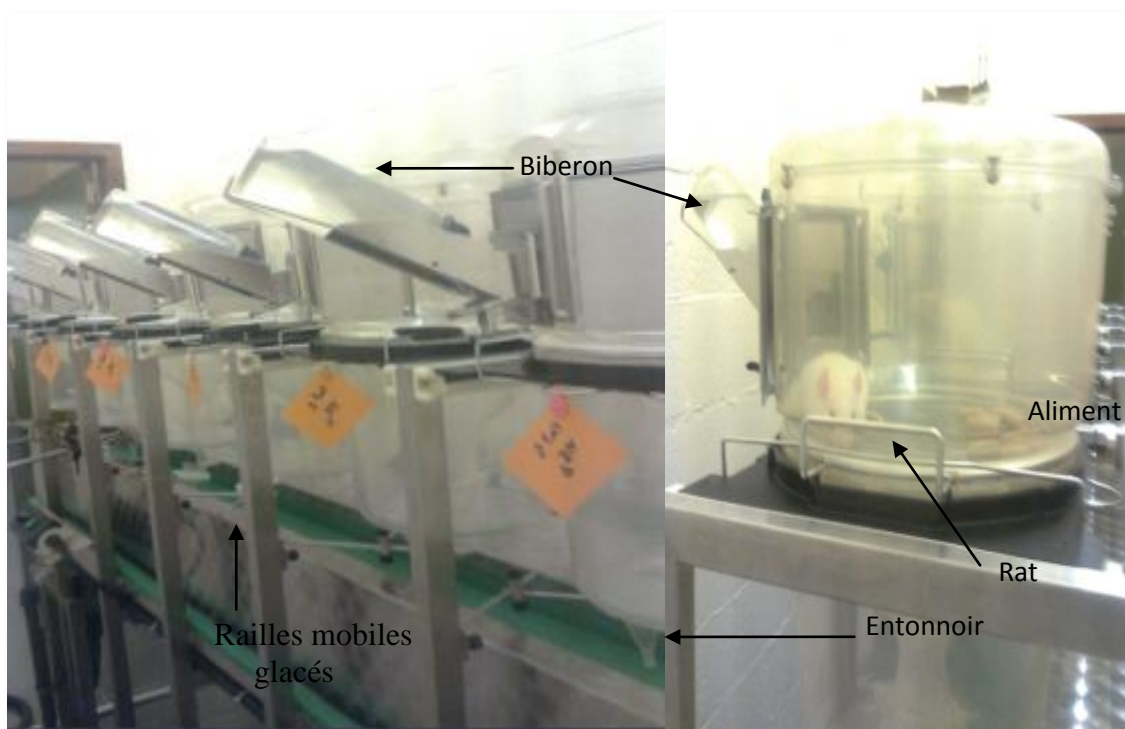


Figure 33: Rats wistar logés dans des cages métaboliques individuelles.

### **III.1.2. Conduite de l'essai**

Les animaux ont été répartis en trois groupes de trois animaux chacun. Dans le premier groupe, les animaux témoins ont reçu des injections intrapéritonéales quotidiennes d'huile de maïs pendant quatre jours. Les animaux du second groupe ont reçu des doses IP quotidiennes d'huile essentielle de thym, à 0,2 % ou 2 % (HE0.2 et HE2, respectivement) ou de l'extrait polyphénolique à 20 % ou 50% (EP20 et EP50, respectivement). En parallèle, un troisième groupe d'animaux a reçu l'acétone diluée à 70 % (AC70), solvant utilisé pour diluer l'extrait polyphénolique, ce groupe est conçu dans le but de déterminer l'effet de solvant. Les rats ont été euthanasiés le cinquième jour.

#### ***III.1.2.1. Chimie clinique***

L'analyse des échantillons de sang est effectuée à l'aide d'un automate Menarini (diagnostic A.MENARINI) en utilisant des kits appropriés, dont les paramètres suivants ont été testés: protéines totales (T-Pro), albumine (Alb), bilirubine totale (T- Bil), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), lactate déshydrogénase (LDH), urée (BUN), créatinine (CRE) et l'acide urique (UA).

#### ***III.1.2.2. Histopathologie***

Le poumon, le rein et un lobe du foie, ont été prélevés à l'autopsie et immédiatement fixés dans une solution de Bouin pendant 24 heures (annexe III), trois bains d'Ethanol sur 24h suivis de trois bains de Butanol, ensuite les échantillons sont trempés dans des bains de paraffine trois fois pour assurer la fixation. Les cassettes contenant les organes fixés au paraffine sont envoyés au service BiodOxis de pathologie expérimentale (Romainville, France), dont les échantillons ont été soigneusement préparés et colorés avec de l'hématoxyline-éosine avant d'être analysés par microscopie photonique. La lecture des coupes et les interprétations ont été faites par Dr. Jean Michel Caillaud, docteur en médecine et histocytologiste, et Dr. Laura Caplier, docteur en médecine vétérinaire et diplômée en histopathologie vétérinaire.

### **III.1.2.3. Etude métabonomique**

Durant cette expérimentation, les échantillons d'urine ont été prélevés toutes les 24 heures dans des tubes refroidis (placés sur des railles glacés) contenant 1ml d'une solution d'azide de sodium à 1%, les échantillons sont immédiatement conservés à -80°C, pour des analyses RMN ultérieures.

#### **III.1.2.3.1. Spectroscopie $^1\text{H}$ RMN de l'urine :**

Les échantillons d'urine ont été centrifugés 5 min à 5000 g (à 4 °C) pour enlever les débris solides. Des aliquotes (400  $\mu\text{l}$ ) de surnageant ont été retirés de microtubes et mélangés avec 200  $\mu\text{l}$  de tampon 0,2 M de phosphate de sodium (0,04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) préparés dans un mélange de 80/20  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ . Une micromole d'acide propionique triméthylsilyl deutéré (TSP) a été utilisée comme une référence externe. A partir de ce mélange, 550  $\mu\text{l}$  ont été transférés dans des tubes à RMN de 5 mm et analysés par spectroscopie  $^1\text{H}$ -RMN dans un système RMN Bruker à 500 MHz (Bruker, Karlsruhe, Allemagne). La suppression des signaux de l'eau résiduelle a été réalisée par l'intermédiaire de la séquence d'impulsions NOESYPRESAT, dans lequel le pic de l'eau résiduelle est irradié pendant le délai de relaxation (1,5 s), et pendant le temps de mélange (0,1 s). Pour chaque échantillon, les spectres ont été recueillis à l'aide de 64 scans contenant 54832 points de données à une largeur spectrale de 10,330.6 Hz, avec un temps d'acquisition de 2,7 s et un temps de relaxation de 3,0 s.

#### **III.1.2.3.2. Réduction de données et d'analyse en composantes principales :**

Pour tous les spectres, les phases et les lignes de base ont été corrigées manuellement, et les données ont été réduites à 250 sous-régions d'une largeur égale (0,04 ppm) en utilisant le logiciel MestreNova 5.2.0 (Mestre Research Lab, Santiago de Compostela, Espagne). Les segments allant de 4,5 à 5,0 ppm et de 5,5 à 6,0 ppm ont été retirés pour exclure l'incertitude des signaux de l'eau résiduelle et de l'urée, respectivement.

Ensuite, tous les segments restants ont été normalisés par rapport à la zone intégrée totale du spectre. Les données spectrales  $^1\text{H}$ -RMN ont été importés dans le logiciel SIMCAP +12 (Umetrics AB, Suède) pour des analyses de PCA. Ensuite, les scores plots ont été utilisés pour visualiser toute séparation possible entre les échantillons d'urine (i.e., groupes

d'animaux) et les loadings plots correspondants ont été utilisés pour identifier les variables, et donc les métabolites urinaires responsables de cette séparation.

## **III.2. STATISTIQUE**

Les données des analyses de la chimie clinique du sang, du poids corporel, la consommation d'eau et de la nourriture ont été exprimés par la moyenne  $\pm$  DS. Les comparaisons statistiques ont été effectuées en utilisant une analyse de variance (ANOVA), et le test de Newman-Keul, le critère de signification statistique a été fixé à  $p < 0,05$ .

## **III.3. RESULTATS**

### **III.3.1. signes physiques et comportement des rats**

La mortalité a été enregistrée dans le groupe d'animaux traités avec l'extrait polyphénolique après la deuxième injection d'extrait à 50 % ( $n = 1$ ) et après la quatrième injection dans le groupe traité avec l'extrait à 20 % ( $n = 1$ ), ceci peut être expliqué par la bioaccumulation d'un ou plusieurs composants contenus dans les extraits injectés ou d'un de ses métabolites. En outre, l'observation des signes physiques a révélée une certaine faiblesse chez les rats vivants traités avec d'extrait polyphénolique à 20 %. Par contre, à l'exception de quelques signes de fatigue chez les rats recevant l'huile essentielle à 2%, aucun décès n'a été constaté chez les animaux recevant l'huile essentielle, quelle que soit la dose appliquée.

### **III.3.2. Effets des extraits sur les consommations d'eau, la nourriture et du poids corporel**

Une diminution spectaculaire de la prise alimentaire a été enregistrée chez les rats traités avec l'extrait polyphénolique, accompagnée d'une diminution du poids corporel dans le groupe EP50. Le gain de poids observé chez le groupe EP20 est très faible en comparaison avec le poids croissant noté chez le groupe contrôle (tableau 7). En revanche, chez les animaux traités avec l'huile essentielle, des augmentations de la consommation de nourriture et de l'eau ont été observées, accompagné d'un gain de poids corporel par rapport à leurs contrôles qui ont reçu uniquement le véhicule.

Tableau 7: Variation des moyennes de consommation et des poids corporels selon les traitements appliqués.

Groupe	Poids corporels (g)		Consommation d'eau (ml)		Consommation de la nourriture (g)	
	1 <sup>er</sup> jours	Dernier jours	1 <sup>er</sup> jours	Dernier jours	1 <sup>er</sup> jours	Dernier jours
<b>Témoin</b>	219±04	231±11	33±07	53±09	18±02	22±06
<b>AC70</b>	217±23	242±31	23±00	26±01 **	30±03	29±01
<b>HE0.2</b>	213±03	233±01	30±03	49±0	22±02	22±03
<b>HE2</b>	211±08	236±06	28±11	48±05	22±01	24±05
<b>EP50</b>	204±12	196±30 **	24±04	18±03 **	27±04	04±03 **
<b>EP20</b>	299±04	307±05 **	33±04	24±06 **	26±02	13±13 *

Valeurs sont moyenne  $\pm$  DS. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$

### III.3.3. Résultats histopathologiques

L'observation au microscope a révélé des aspects normaux à sub-normaux des trois tissus examinés (foie, reins et poumons) provenant d'animaux de groupe contrôle. Pas de lésions microscopiques visibles dans le foie et les tissus rénaux de rats traités avec de l'huile essentielle et l'extrait polyphénolique de thym. Sauf chez les animaux du groupe AC70 ont présenté quelques microvacuoles centrilobulaires cytoplasmique dans les hépatocytes (Fig.34).

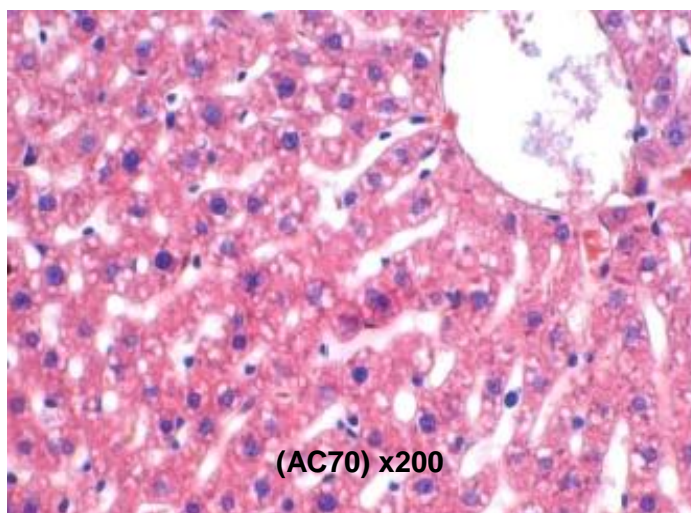


Figure 34: Vacuolization hépatocellulaire centrolobulaire chez le groupe AC70 (X200)

Le tissu pulmonaire a montré un aspect sub-normal avec des foyers d'inflammation péribronchique et périvasculaire minimum chez le groupe EP50 (Fig.35).

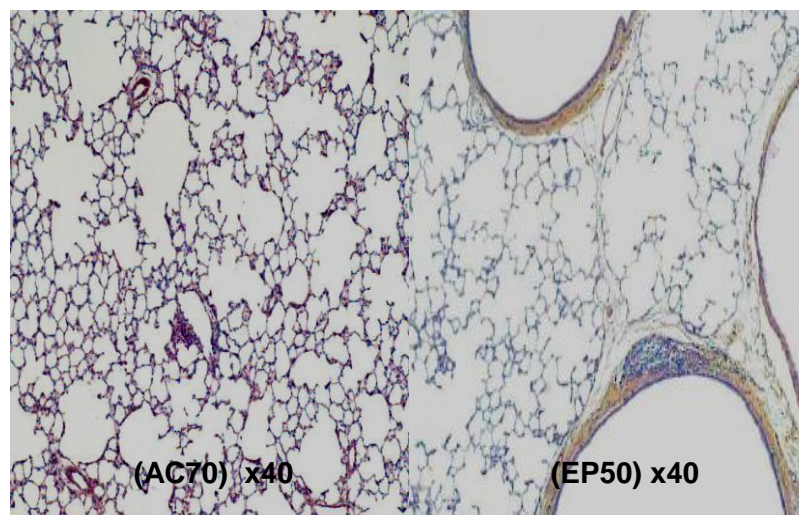


Figure 35: Inflammation péribronchiale et périvasculaire minimale chez les deux groupes EP50 et AC70 (x40).

### III.3.4. Effets des extraits sur les paramètres hépatiques et rénaux

Les résultats n'ont montré aucune différence entre les valeurs de certains paramètres hépatiques : T.pro, T.bil, GOT et GPT (Tableau 8) chez les animaux du groupe témoin recevant l'huile de maïs et ceux qui sont exposés à des extraits de thym. Au contraire, une augmentation dans le niveau de l'acide urique a été observée chez les animaux exposés à la faible dose d'huile essentielle par rapport aux animaux du groupe de contrôle.

Par rapport aux témoins, les rats traités avec les deux doses d'extrait polyphénolique ont montré une augmentation très significative ( $p < 0,001$ ) dans le taux sérique d'acide urique ( $4,80 \pm 0,60$  mg/dl vs  $1,70 \pm 0,42$  mg /dl). Le niveau d'acide urique chez les rats du groupe AC70 était également plus élevé en comparaison avec les rats du groupe témoin recevant l'huile de maïs ( $4,10 \pm 0,90$  mg/dl vs  $1,70 \pm 0,42$  mg/dl). La même observation a été faite dans les taux de créatinine sériques des animaux exposés à l'extrait polyphénolique aux deux doses par rapport aux rats du groupe AC70 ( $p < 0,003$ ). Les animaux ayant reçu des injections de l'acétone et de l'huile de maïs ont présenté un taux de créatinine de l'ordre de  $1,65 \pm 0,85$  mg/dl et  $0,45 \pm 0,07$  mg/dl, respectivement.

En ce qui concerne les paramètres rénaux (BUN, créatinine et d'acide urique), des valeurs proches ont été observées entre les animaux de deux groupes ; contrôle et HE2.

Tableau 8: Valeurs en moyenne des paramètres hépatiques et rénaux chez des rats traités par les extraits de thym et des témoins.

	Contrôle	AC70	HE0.2	HE2	EP50	EP20
<b>T-Pro</b> (g.dl <sup>-1</sup> )	3,80±0,28	4,85±0,25	4,20±0,00	ND	5,30±0,30	5,05±0,45
<b>Alb</b> (g.dl <sup>-1</sup> )	4,3±0,14	3,55±0,25	4,6±0,20	4,5±0,14	3,30±0,10	3,45±0,35
<b>T-bil</b> (mg.dl <sup>-1</sup> )	0,7±0,28	1,10±0,50	ND	0,35±0,07	0,75±0,05	0,55±0,15
<b>GOT</b> (IU. l <sup>-1</sup> )	112,50±30,41	86,00±07,00	101,00±77,78	60,00±14,00	96,50±11,50	94,00±30,00
<b>GPT</b> (IU.l <sup>-1</sup> )	49,00±11,31	75,00±19,00	20,00±08,89*	48,00±12,70	57,00±24,00	43,00±05,00
<b>HDL</b> (IU.l <sup>-1</sup> )	3468,50±571	1335±92,00	3987,00±2631,00	2609,33±48,00	1730±101,00	461,5±91,50
<b>BUN</b> (mg.dl <sup>-1</sup> )	08,50±0,71	11,00±01,00	ND	09,00±0,00	33,50±19,50	13,00±02,00
<b>UA</b> (mg.dl <sup>-1</sup> )	1,70±0,42	4,10±0,90**	2,80±0,00	1,25±0,00	4,80±0,40**	4,80±0,60**
<b>Cre</b> (mgdl <sup>-1</sup> )	0,45±0,07	1,65±0,85**	ND	0,40±0,00	02,00±0,60**	02,30±0,40**

Valeurs moyenne ± DS; \*P<0.05; \*\*p<0,001 ; ND: non déterminée

### III.3.5. Effets des extraits sur le profil métabonomique de l'urine:

#### III.3.5.1.PCA de données 1H RMN

Le PCA scores des spectres <sup>1</sup>H-RMN urinaires sont présentés dans la figure 36A, les scores plots ont révélé que les échantillons d'urine prélevés des animaux exposés à l'huile essentielle pour les deux doses pouvaient être distingués de leur contrôle correspondant. PCA loading plots (Fig.36B) ont montré que les régions spectrales qui contribuent le plus à la séparation des groupes observés dans les scores plots sont des réductions dans les niveaux de citrate ( δ2.52 , δ2.57 , δ2.65 , δ2.69), de la taurine (δ3.25 , δ3.43) et l'hippurate (δ 3.97, δ7.55 , δ7.64 , δ7.84) ont été observées chez les animaux traités, accompagnée d'une augmentation dans les niveaux de diméthylglycine (δ2.92), alanine (δ1.48), β-hydroxybutyrate (δ1.20), glucose (δ4.65) , le lactate (δ1.34 , δ 4.12) et de l'acétate (δ1.94).

PCA des groupes traités avec des extraits polyphénoliques a montré une diminution des niveaux de citrate, α-ketoglutarate (δ2.44, δ3.01), trans-aconitate (δ6.62), diméthylglycine,

diméthylalanine, hippurate et de la taurine, avec des niveaux élevés de glycoprotéines ( $\delta 2.06$ ), le sucre, l'acétoacétate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\delta 2.23$ ) (Fig.37 A, B).

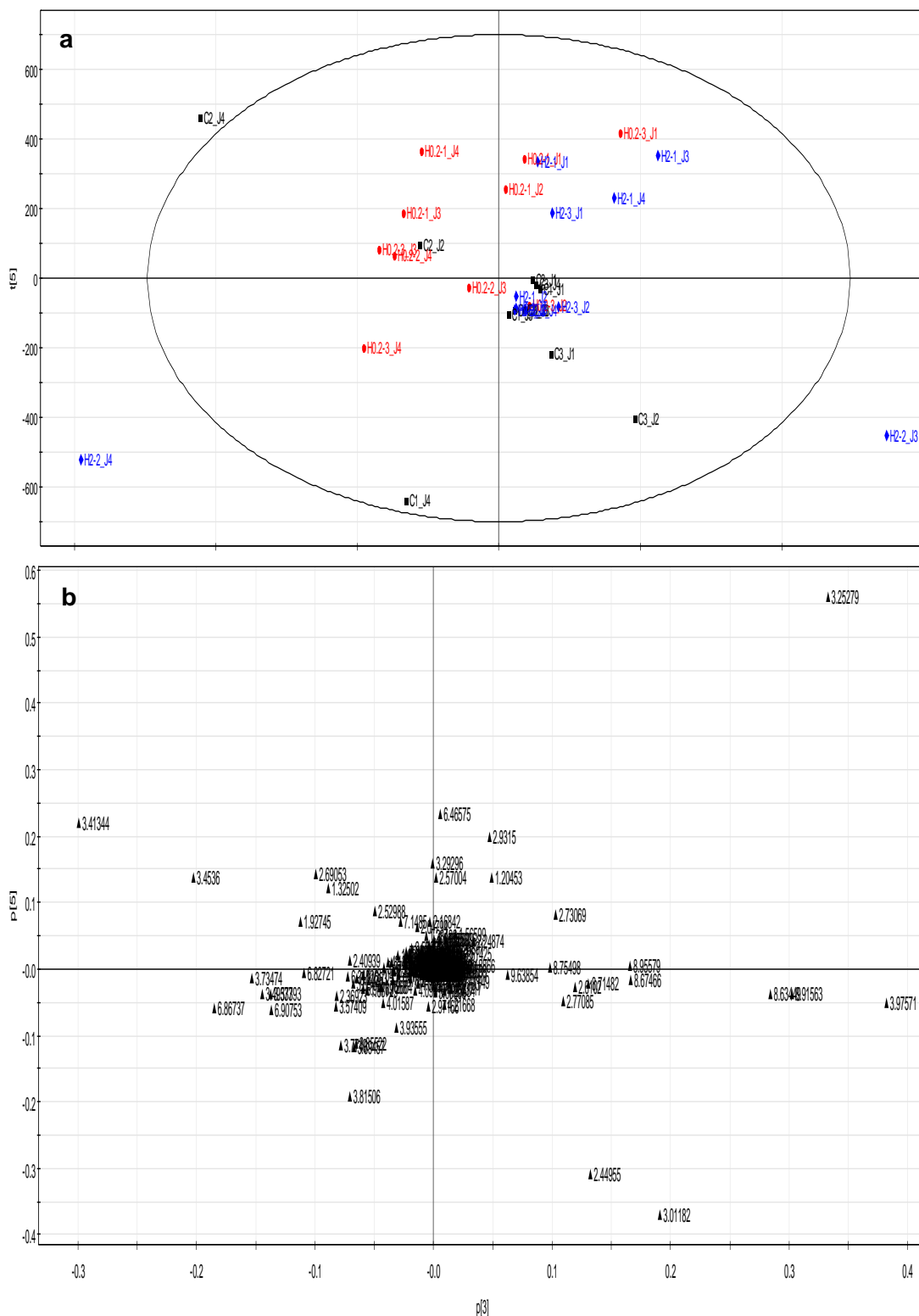


Figure 36: Scores plot et loadings plot dérivés des spectres  $^1\text{H-NMR}$  d'urine des rats traités par l'huile essentielle de thym (control: noire, groupe EP20: rouge, groupe EP50: blue).

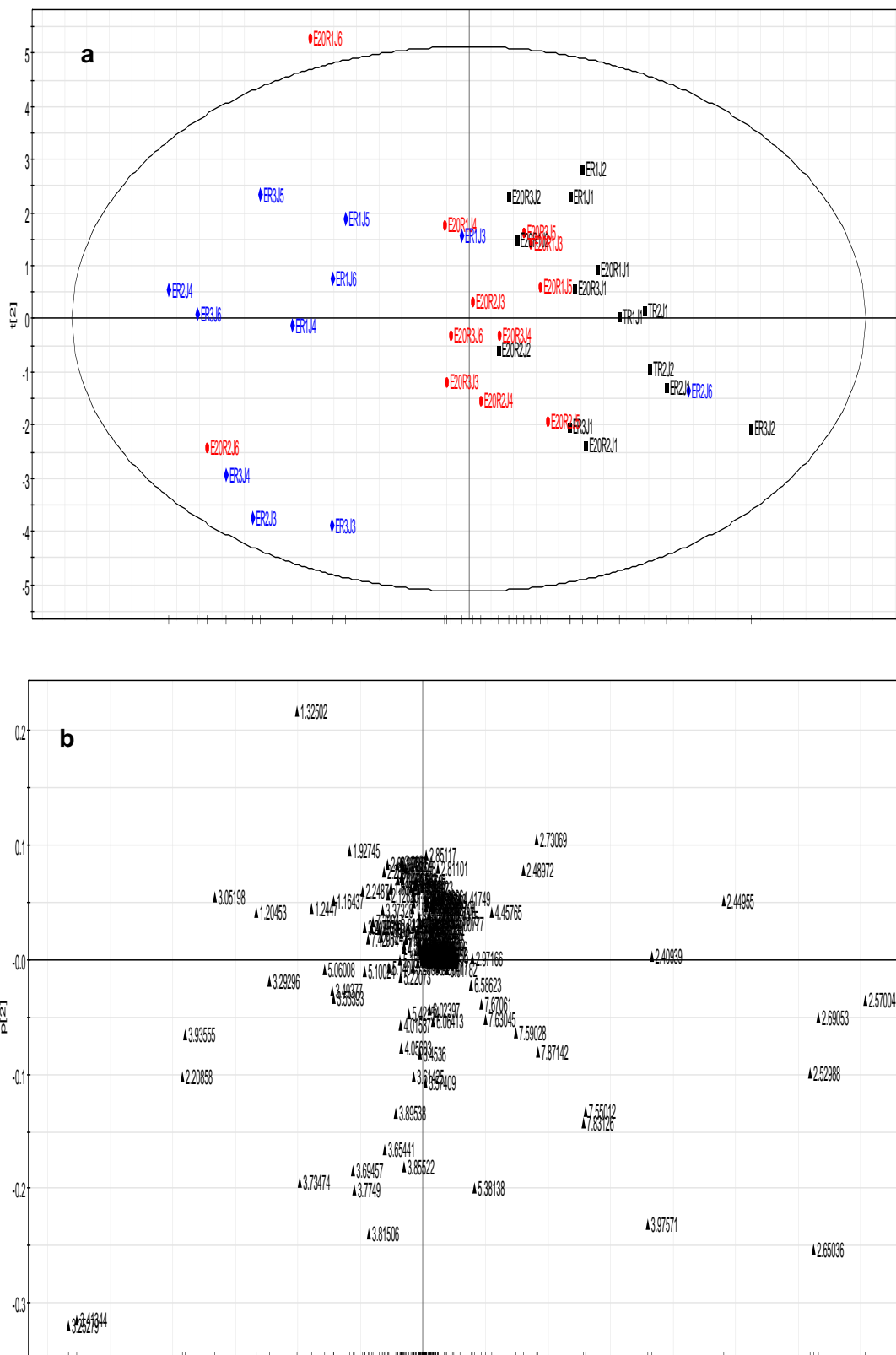


Figure 37: Scores plot et loadings plot dérivés des spectres <sup>1</sup>H-NMR d'urine des rats traités par l'extrait polyphénolique de thym (control: noire, groupe EP20: rouge, groupe EP50: blue).

### III.3.5.2. Spectres 1H-RMN de l'urine

Les spectres 1H-RMN obtenus à partir des échantillons d'urine des rats exposés à huile essentielle de thym a révélé des différences dans la composition par rapport à leurs témoins.

Un spectre typique d'urine obtenu à partir de rats exposés à la faible dose d'huile essentielle est représenté sur la figure 38. Peu de différences entre les spectres d'urine des animaux traités par rapport aux témoins ont été observés; diméthylglycine ( $\delta$ 2.92), diméthylamine ( $\delta$ 2.73) et deux pics fumarate ( $\delta$ 6, 53 et  $\delta$ 8.46).

Par contre, des différences spectaculaires dans la composition métabolique de l'urine ont été observées entre les groupes d'animaux exposés à la dose élevée d'huile essentielle par rapport au contrôle. Les changements les plus notables sont liés à l'apparition de pics d'acétate ( $\delta$ 1.94),  $\beta$ -hydroxybutyrate, l'alanine et le lactate. Une diminution des taux de taurine et de l'hippurate est corrélée avec une augmentation de l' $\alpha$ -glucose et de  $\beta$ -glucose.

Chez les animaux traités par l'extrait polyphénolique, une perturbation encore plus grande du métabolisme intermédiaire a été enregistrée. Aux deux doses, la réduction des niveaux des métabolites intermédiaires du cycle de Krebs et de la créatinine ( $\delta$ 3.05 et  $\delta$ 4.06) ont été observés avec des niveaux relativement élevés de corps cétoniques, acétoacétate ( $\delta$ 2.23), l'acétate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate. À faible dose, des augmentations significatives de lactate, acétate et choline ( $\delta$ 3.21) ont été enregistrées accompagnées avec une baisse de citrate,  $\alpha$ -cétoglutarate, de la créatinine et l'hippurate. A la dose élevée (EP50), des niveaux inférieurs de citrate,  $\alpha$ -cétoglutarate et le succinate ont été observés. La diminution des concentrations a également été observée pour certains acides aminés tels que diméthylglycine, diméthylalanine, taurine et trans-aconitate, ainsi qu'une absence de la résonance qui correspond au lactate dans les spectres de rats exposés à la faible dose de l'extrait (Fig.39).

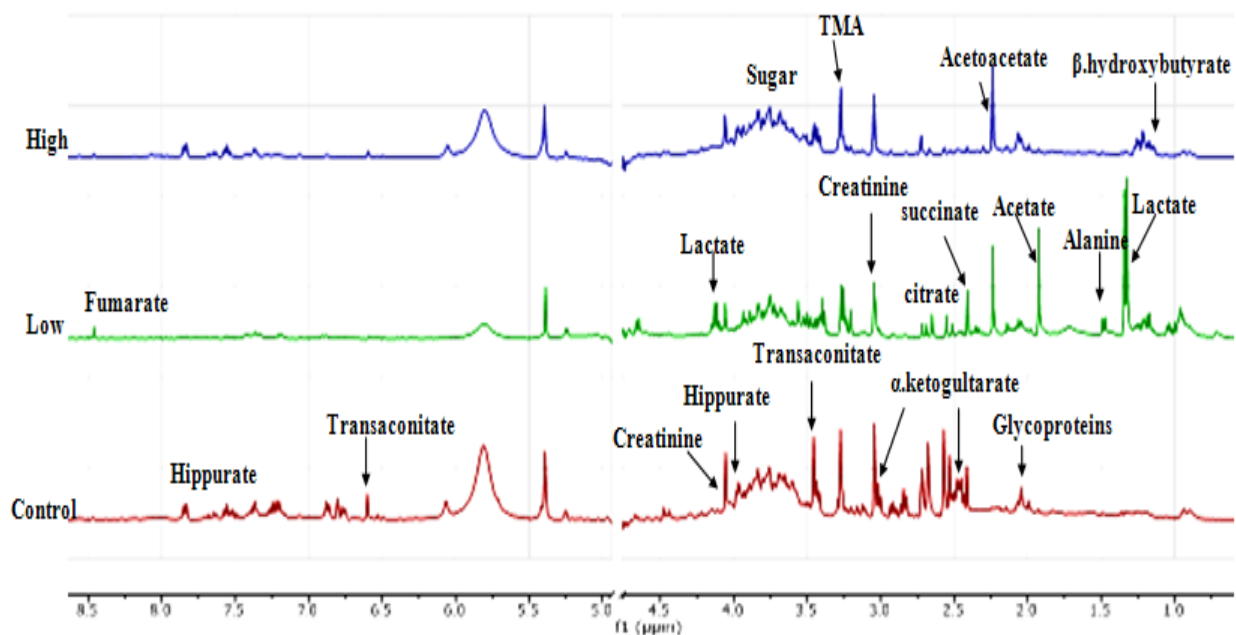


Figure 38: Spectres 1H NMR d'urine des rats traités par l'huile essentielle de thym à la faible et forte dose.

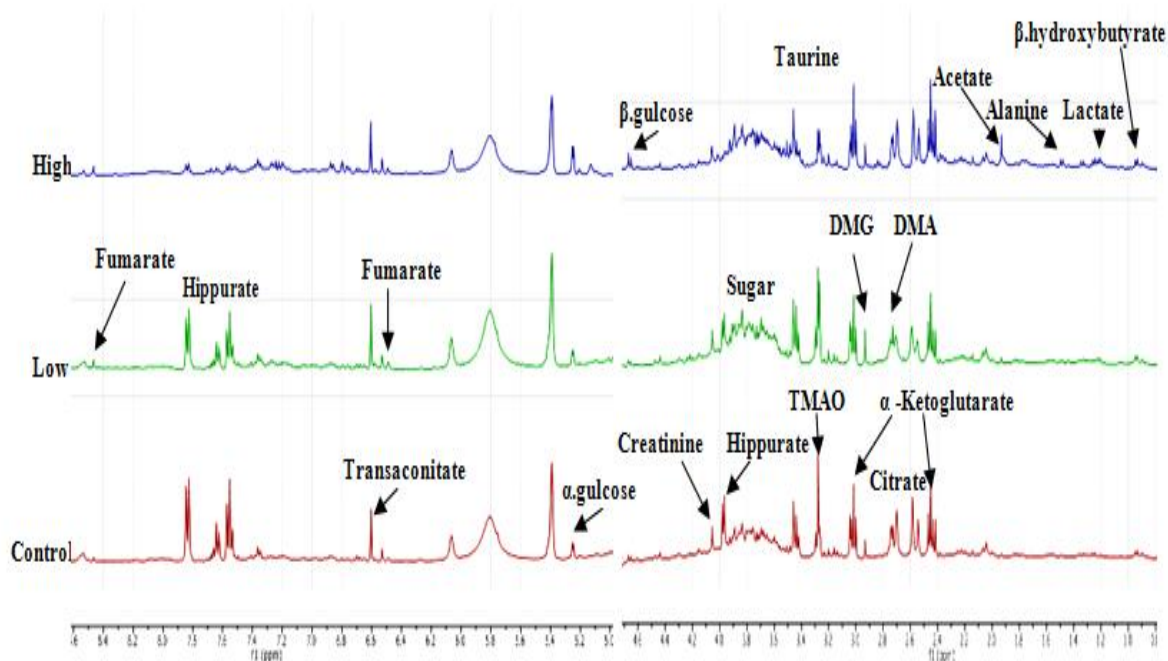


Figure 39: Spectres 1H NMR d'urine des rats traités par l'extrait polyphénolique de thym à la faible et forte dose.

### III.4. DISCUSSION

Dans les conditions de notre protocole expérimental, aucun changement significatif n'a pu être observé dans l'examen histopathologique du foie et les tissus rénaux des rats exposés aux extraits de thym, sauf une inflammation péribronchiques péri-vasculaire observée dans les poumons de rats traités avec l'extrait polyphénolique dilué à 50%, et des microvacuoles centrilobulaires cytoplasmiques dans les hépatocytes de groupe AC70. L'effet est probablement dû à l'acétone utilisée pour la dilution de l'extrait, ceci est confirmé par les effets de solvant sur les paramètres rénaux et hépatiques dans le groupe AC70.

Ces données sont cohérentes avec les résultats de Sakr et Al- Amoudi (2012), qui n'ont observé aucune lésion tissulaire chez des rats traités avec l'extrait d'*Ocimum basilicum*. Comme le thym, cette plante appartient à la famille des Lamiacées. Plusieurs constituants chimiques sont présents à la fois dans les extraits de ces deux plantes; le thym et le basilic. (Lee et al., 2005)

Les données de Fachini-Queiroz et al. (2012) suggèrent qu'aucun effet secondaire n'a été observé sur le comportement des animaux exposés à huile essentielle de thym. La valeur élevée de la DL50 a suggéré également que huile essentielle de thym est relativement sûr et non toxique. Selon Abd el-Kader et Mohamed (2012) le pouvoir protecteur de l'extrait est confirmée par une amélioration significative dans l'architecture du foie et de du rein. Selon ce dernier, le thym produit de faibles changements dans les tissus rénaux qui peuvent être complètement supprimés en utilisant des doses plus faibles de l'extrait.

Dans cette étude, l'innocuité de l'extrait vis-à-vis du foie a été confirmée par l'absence de changements dans les niveaux de GOT et GPT chez les rats traités avec les extraits de thym. Selon les résultats obtenus, aucun effet sur le métabolisme du foie chez les deux groupes traités avec l'huile essentielle de thym n'est observé. Les résultats d'Al-Badr (2011) concordent ces résultats, qui montrent que l'huile essentielle de cette plante a un effet inoffensif sur les tissus du foie et du rein, sauf des changements modérés dans l'activité des aminotransférases.

Dans cette investigation des niveaux élevés de bilirubine sérique sont enregistrés, ceci peut être dû à une hémolyse excessive des échantillons, à une cytotoxicité au niveau du foie ou d'une obstruction des voies biliaires. Cependant, l'étude histologique n'a pas révélé de lésion dans les tissus du foie après l'administration de l'extrait. Cela pourrait s'expliquer par des

mécanismes d'autorenouveau et de réparation des hépatocytes qui peuvent contribuer à se remettre de la blessure au moment de l'autopsie. (Okokon, 2010)

Concernant les trois marqueurs de l'insuffisance rénale (Crea, BUN et UA), des valeurs élevées et significativement différentes de leur contrôle ont été enregistrées dans les deux groupes d'animaux exposés à l'extrait polyphénolique. Cet effet peut être dû au solvant utilisé pour diluer l'extrait puisque le même changement est observé chez le groupe AC70. Contrairement aux résultats de l'histopathologie, les taux sériques de ces paramètres tendent à démontrer le développement d'une dysfonction rénale chez les trois groupes EP20, EP50 et AC70. Comme il est bien connu, les taux sériques élevés de créatinine et d'urée sont des indicateurs clairs d'atteinte rénale (Shalaby et *al.*, 2011; . Sakr et Al- Amoudi 2012; Sivachandran et Hariharan, 2012).

Sur la base des résultats de l'analyse métabolomique, les changements métaboliques les plus remarquables sont l'augmentation des niveaux de glucose, lactate, et l'apparition de corps cétoniques pour les groupes traités par l'huile essentielle. Ces changements peuvent être dus à une réabsorption rénale défectueuse, une expression typique de dommage tubulaire proximale non spécifique (Gartland et *al.*, 1989 in: Wang et *al.*, 2011). La perte de glucose dans les urines serait à l'origine d'un déséquilibre énergétique dans les tissus, qui pourraient être contrecarrées par la production de corps cétoniques. D'autre part, des études récentes ont montré que l'augmentation des niveaux de glucose et de lactate dans l'urine des animaux exposés à des xénobiotiques sont en rapport avec des déficiences mitochondriales (Lu et *al.*, 2010; Wang et *al.*, 2011). Des niveaux accrus de ces métabolites sont en corrélation avec l'augmentation des niveaux de choline dans les groupes traités avec l'extrait polyphénolique. Des niveaux élevés de ce dernier dans l'urine pourraient être le signe d'une lésion dans les hépatocytes, par perturbations de métabolisme des acides aminés et des acides gras (Wang et *al.*, 2011).

Chez les groupes exposés à l'extrait polyphénolique, les observations les plus remarquables sur les spectres d'urine sont l'apparition des pics de résonance des corps cétoniques, dérivant d'un ralentissement de l'activité du cycle de Krebs comme le montrent les faibles taux de citrate et de  $\alpha$ -cétoglutarate. L'apport alimentaire réduit chez les rats exposés à l'extrait conduit à l'activation des voies de la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation, ce qui peut expliquer l'apparition de corps cétoniques et de lactate. Les corps cétoniques sont synthétisés principalement dans le foie après épuisement des réserves de glucides cellulaires (glycogène). Les acides gras sont décomposés par  $\beta$ -oxydation en acétyl-CoA. Lorsque

l'acétyl-CoA est produit en excès, le cycle de Krebs ralentit comme indiqué par les niveaux inférieurs de ses composés intermédiaires. L'acétyl -CoA sera alors utilisé pour la biosynthèse de l'acétoacétate,  $\beta$  -hydroxybutyrate et d'acétone (Felipe et *al.*, 2012).

Selon Schoonen et *al.* (2007), le cycle TCA semble être entravé au cours d'une nécrose, cholestase et une stéatose. La production de citrate,  $\alpha$ -ketoglutarate et succinate est réduite dans les trois pathologies, ces acides organiques peuvent être les marqueurs les plus universels de la pathologie cellulaire. Les niveaux d'acides organiques réduits suggèrent que la phosphorylation oxydative est inhibée et que la glycolyse anaérobie est augmentée. Tel que rapporté par Lu et *al.* (2011), la baisse du niveau de citrate dans l'urine suggère un affaiblissement du cycle de Krebs à cause de la défektivité dans le fonctionnement des mitochondries. Une diminution du niveau de hippurate a également influencé la répartition des observations sur les scores plots. Selon les données de Schoonen et *al.* (2007), une diminution dans la formation de l'hippurate est un autre marqueur d'une pathologie cellulaire hépatique. Une diminution dans la phosphorylation oxydative mènera aussi à une diminution dans la formation de l'hippurate dans les mitochondries du foie chez les rats. La réduction de l'hippurate peut également provenir d'une lésion rénale lorsque la sécrétion tubulaire est perturbée. Tel que rapporté par Zuppi et *al.* (1997), une diminution de l'hippurate urinaire peut être le signe d'une altération métabolique et, plus important, de l'efficacité de la sécrétion tubulaire.

En conclusion, l'extrait polyphénolique de thym a probablement affecté l'activité du cycle de Krebs, ainsi que le métabolisme des acides gras et des acides aminés aux doses appliquées dans cette étude. Cela peut être dû à un apport alimentaire négligeable, dans le cas des injections de l'extrait à des doses élevées. D'autre part, cet extrait est responsable d'un trouble dans la fonction rénale en induisant un stress oxydatif dans les reins. Enfin, vue les résultats obtenus, l'importance des effets indésirables générés après injection à doses répétées de l'huile essentielle de thym est beaucoup plus faible par rapport aux traitements appliquée par l'extrait polyphénolique. Par comparaison avec les résultats des examens histopathologiques des tissus du foie et des reins, l'étude métabonomique a montré des variations dans l'excrétion urinaire de certains métabolites, même à la dose la plus faible de l'extrait. Une évaluation de ces mêmes paramètres, quelques jours après l'ingestion de l'extrait et de huile essentielle sont nécessaires pour déterminer si ces effets sont réversibles ou non.

CONCLUSION

GÉNÉRALE

## CHAPITRE IV

### Conclusion Générale

Les maladies cryptogamiques causent des dégâts majeurs sur les cultures maraichères en général, et particulièrement la culture de tomate. Les agents pathogènes telluriques ou foliaires peuvent attaquer les plants en plein champ ou même le produit au cours de son stockage. La lutte chimique reste souvent l'issue la plus utile par un épandage massif d'un ou plusieurs pesticides appropriés. Cependant, la bioaccumulation dans l'environnement et la non biodégradabilité de certains molécules posent un problème majeur, la santé humaine et particulièrement celle de l'agriculteur est menacé par une exposition accrue aux pesticides conventionnels. D'autre part, des générations de bioagresseurs résistants apparus au cours du temps suite à des applications intensives et épandage excessives de ces produits.

Le recours à des substances naturelles suscite un intérêt croissant dans la recherche. Le présent travail apporte des données encourageantes sur l'application des extraits naturels comme biopesticides remplaçant les pesticides conventionnels.

Les extraits de thym à des doses relativement faible ont donné des résultats très prometteurs tout en limitant le développement mycélien et la sporulation des isolats par contact direct, dont les isolats *Botrytis cinérea* et *phytophthora infestans*; causant des maladies foliaires chez la tomate, présentent une haute sensibilité vis-à-vis les doses appliquées des deux extraits huile essentielle et extrait polyphénolique de thym. *In vivo*, les traitements appliqués préventivement manifestent une efficacité spectaculaire, dont aucun signe d'invasion des maladies induites n'est apparu sur les plants traités par voie racinaire et même ceux issus de semences traitées par exposition aux substances volatiles émanées.

Les résultats de la RT-qPCR ont montré l'induction de l'expression du gène codant pour la protéine PR1-P6 à plus de 200fois et de la chitinase 4 (PR3) pour plus de 50 fois. Cependant, aucun effet n'est observé sur l'induction du gène codant pour la protéine PR2 (glucanase 1). Concernant les métabolites secondaires impliqués dans la défense, selon les résultats de SDS-PAGE la synthèse de PR-protéines n'a pas eu lieu. Néanmoins, la PR1-P6 n'est dévoilé qu'après une analyse par le western blot.

D'autre part, dans ces conditions expérimentales l'analyse de métabolites de la tomate extraites par l'acétone 48hpt par pulvérisation ne montre aucune augmentation de taux de composés phénoliques intervenant dans le processus de défense ; comme dans le cas du renforcement pariétal afin de retarder la pénétration de l'agent pathogène par exemple ou d'empêcher la diffusion des toxines ou enzymes impliquées dans le processus de dégradation des parois. Les pics apparus sur le chromatogramme (HPLC) ne correspondent que pour les composés phénoliques existant déjà dans l'extrait de thym, ainsi que d'autres pics correspondent aux métabolites habituels des extraits de feuilles de tomate.

Afin d'identifier le support moléculaire responsable des activités biologiques des extraits, l'analyse chromatographique (à 300nm) de l'extrait hydroalcoolique de thym a révélée la présence des composant phénoliques dont les activités biologies sont très étudiées dans la littérature comme le thymol, l'apigénine, l'acide rosmarinique, le naringénine. De plus l'analyse a dévoilé la présence de l'acide salicylique, très connu comme molécule signal, régulatrice des voies de défense chez les végétaux.

Sur le plan toxicologique, l'application des extraits à des doses répétées présente un dysfonctionnement hépatocytaire, Les résultats ont montré des altérations de la glycolyse, du cycle de Krebs, et des voies de  $\beta$ -oxydation, comme en témoignent l'augmentation du taux de lactates et des corps cétoniques, et la diminution des taux de citrate,  $\alpha$ -cétoglutarate, de la créatinine, hippurate, diméthylglycine, et diméthylalanine. Ce travail a montré que les injections IP de doses répétées d'extraits de thym provoquent certains troubles du métabolisme intermédiaire chez le rat. L'étude métabolomique a révélé des données intéressantes qui pourraient être utilisées davantage pour déterminer les voies cellulaires affectées par un tel traitement. D'après ces résultats il paraît plus intéressant de reconditionné les extraits par une élimination complète du solvant extractant. C'est ce qui a été testé dans la partie prospectant l'effet inducteur de la défense dont on a éliminé complètement le solvant extractant qui a été remplacé par l'eau distillée autoclavée.

Au terme des travaux, les résultats auxquels nous sommes parvenus nous permettent d'affirmer que :

Ces extraits ont des potentialités phytosanitaires très intéressantes, avec une double action :

- ✓ une action directe sur les agents pathogènes ;
- ✓ et action inductrice de la défense naturelle chez les plants traités ;

La toxicité de l'extrait hydroalcoolique due probablement à l'acétone utilisé pour la dilution de l'extrait.

En vue de poursuivre les investigations sur le sujet, les points suivants pourraient être pris en compte :

Reprendre les tests de l'évaluation *in vivo* de la toxicité des extraits. avec la mise au point d'un protocole approprié qui puisse refléter au mieux les conditions réelles. Comme par exemple l'élimination totale de l'alcool par évaporation rotative de l'extrait polyphénolique avant de tester la toxicité, ceci dans le but de vérifier l'innocuité du mélange, d'identifier le composant responsable des altérations ou les perturbations du cycle énergétique par exemple.

Reprendre les tests *in vivo* sur plantules pour plusieurs pathosystèmes et pour les deux extraits.

Confirmer les résultats par d'autres tests puis procéder à une application en plein champ.

Afin d'éviter tout risque de toxicité, l'application des extraits doit se faire par traitement de semences ; dans nos conditions ce traitement a donné le même résultat que le traitement sur plantules.

D'une manière générale, il est très bénéfique de s'orienter vers l'exploitation et la valorisation des ressources naturelles autochtones, très riche en matières biologiquement actives pour une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement et de la santé humaine.

# REFERENCES

## ○ A

- Abd El Kader M.A. and Mohamed N.Z., 2012. Evaluation of Protective and Antioxidant Activity of Thyme (*Thymus Vulgaris*) Extract on Paracetamol-Induced Toxicity in Rats .Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 6(7): 467-474.
- Adam Akram. 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxigénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de doctorat en sciences. Centre wallon de Biologie Industrielle, université de liège, 163p.
- Afroz A., Khan R., Ahsan N., Komatsu S., 2009. Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. Peptides. Vol. 30(9):1600-7. doi: 10.1016.
- Ait M'barek L, Ait Mouse H, Jaâfari A, Abou-fatima R, Benharref A, Kamal M, Bénard J, El Abbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Chait A, Dalal A, Ziad A., 2007 . Cytotoxic effect of essential oil of thyme (*Thymus broussonettii*) on the IGR-OV1 tumor cells resistant to chemotherapy. Braz J Med Biol Res.40(11):1537-44.
- Al Badr N.A., 2011. Effect of thyme powder, extract and oil on carbon tetrachloride-induced liver injury. Journal of American Science;7(3).
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, et al., 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 7327-7331.
- Al-Fatimi M., Wurster M., Schröder G.and Lindequist U., 2010. *In vitro* Antimicrobial, Cytotoxic and Radical Scavenging Activities and Chemical Constituents of the Endemic *Thymus laevigatus* (Vahl). *Rec. Nat. Prod.* 4:1 p 49-63

- Alkahtani M, Omer S.A., El-Naggar M.A., Abdel-Kareem E.M. and Mahmoud M.A., 2011. Pathogenesis-related Protein and Phytoalexin Induction against Cucumber Powdery Mildew by Elicitors. *International Journal of Plant Pathology*, 2: 63-71.
- Al-Rahmah A. N., Mostafa A. A., Abdel-Megeed A., Yakout S. M., and Hussein S. A. 2013. Fungicidal activities of certain methanolic plant extracts against tomato phytopathogenic fungi. *African Journal of Microbiology Research* Vol.7(6), pp.517-524, 5.
- Amiot J.,2005 *.Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier, 136 p.
- An M., Pratly JE., Haig T., 1997. Phytotoxicity of vulpia residus: I. investigation of aqueous extracts. *J chem. Ecol.* 23:1979-1995.
- Arras G. et Usai M., 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest *Citrus* pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J. Food Prot.* 64, 1025-1029.
- Asano T , Miwa A, Maeda K, Kimura M, Nishiuchi T. 2013.The Secreted Antifungal Protein Thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* Suppresses the Toxicity of a Fungal Fruit Body Lectin from *Fusarium graminearum*. *PLOS Pathogens*; V9 (8) DOI: 10.1371/journal.ppat.1003581.

## ○ B

- Barbosa Cavalcante M., 2009. Imagerie cellulaire de l'interaction *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis*. Thèse de doctorat en Biologie Intégrative des Plantes. Ecole doctorale sibaghe,146p.
- Beckers GJ, Conrath U., 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Curr Opin Plant Biol* 10: 425–431.

- Benhamou N., Kloepper J.W., Quadt-Hallman A. & Tuzun S., 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol.*, 112, 919-929.
- Benhamou N., Rey P., Cherif M., Hockenhull J. and Tirilly Y., 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defence-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Phytopathology* 87:108–121.
- Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J., 2006. *Thymus* essential oils: chemical composition and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies, Agadir.* 324-327.
- Bruce, R.J. and West, C.A. 1989. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.* 91: 889-897.
- Bruneton J., 1999. *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales.* 3ème Ed Tec&Doc. Paris.

## ○ C

- Castroverde Christian Danve M., 2010. Defence gene expression in the Tomato-*Verticillium* pathosystem. These of Master of Science. The Faculty of Graduate Studies of the University of Guelph. P: 148.
- Ciavareli Lucas G., Alves E., Borges Pereira R., Zacaroni A.B., Perina F.J. and Magela de Souza R., 2012. Indian clove essential oil in the control of tomato bacterial spot. *Journal of Plant Pathology.* 94 (1), 45-51
- Chassot C., Buchala A., Schoonbeek H. J., Metraux J. P., Lamotte O., 2008. Wounding of *Arabidopsis* leaves causes a powerful but transient protection against *Botrytis* infection. *Plant J.* 55 555–567.

- 
- Chen Y.Y., Lin Y.M., Chao T.C., Wang J.F., Liu A.C., Ho F.I., Cheng C.P., 2009. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogenactivated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiol Plant*.
  - Chun S. S., Vatter D.A., Lin Y.T., Shetty K., 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process. Biochem.* 40:809-816.
  - Colebrook E.H., Thomas S.G., Phillips A.L. and Peter Hedden., 2014. *Journal of Experimental Biology.* 217, 67-75 doi:10.1242/jeb.089938.
  - Colville L, Smirnoff N., 2008. Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient *Arabidopsis thaliana* vtc mutants. *J Exp Bot* 59: 3857-3868.
  - Conrath U., Pieterse C-M.J., Mauch-Mani B., 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7: 210–216
  - Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM, Poinssot B, Pozo MJ, et al., 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1062–1071.
  - Costa C-A.R., Bidinotto L.T., Takahira R.K., Salvadori D-M.F., Barbisan L-F., Costa M.. 2011. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. *Food and Chemical Toxicology* 49 : 2268–2272
  - Cueto-Wong M.C., Rivas-Morales C., Alanís-Guzmán M.G., Oranday-Cárdenas A., Amaya-Guerra C.A., Núñez-González A., Samaniego-Gaxiola J.A., Cano-Ríos P., 2010. Antifungal properties of essential oil of *Mexican Oregano* (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Revista Mexicana De Micología* 31: 29-35.

○ **D**

- De bernonville T.D., 2009. Caracterisations histologique, moleculaire et biochimique des interactions compatible et incompatible entre erwinia amylovora, agent du feu bacterien, et le pommier (*malus x domestica*).Thèse de doctorat biologie cellulaire et végétale. INRA-A grocampus Ouest-Université d'Angers. 180p.
- Dixon DP, Davis BG, Edwards R., 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*277: 30859–30869.
- Dghim A A., 2012. Régulation du métabolisme carboné sous ozone : rôles de la Phosphoenolpyruvate carboxylase(PEPC) et des enzymes NADP-dépendantes. Thèse de doctorat en biologie végétale et forestière. Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lorraine. 245p.
- Doumbouya M., ABO K., Lepengue A.N., Camara B., Kanko K., Aidara D., Kone D., 2012. Activités comparées *in vitro* de fongicides de synthèse et deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraichères en cote d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 50. P: 3520-3532
- Dubreuil C., 2010. Mode d'action De l'acide  $\beta$ -aminobutyrique chez la vigne : un inducteur de resistance aux pathogenes et etude des mecanismes impliquees dans la sensibilite aux pathogenes du mutant *pad2* d'arabidopsis deficien en glutathion. Thèse de doctorat en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université de Bourgogne. 190p.
- Duquesne M, Goossens C, Dika Ž, Conotte R, Nortier J, Jelaković B and Colet JM., 2012. Metabonomics: on the Road to Detect Diagnostic Biomarkers in Endemic (Balkan) Nephropathy. Evaluation in a Retrospective Pilot Project. *J Cancer Sci Ther*, S18

○ **E**

- El-Banna H, Soliman M, wabel N., 2013. Hepatoprotective Effects of Thymus and Salvia Essential oils on Paracetamol-Induced Toxicity in Rats. J. Phys. Pharm. Adv. 3(2): 41-47. doi:10.5455/jppa.20130228054608.
- El-Bouzidi L., Jamali CA., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D.N., Abbad A., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. Industrial Crops and Products, vol. 43, pp. 450-456.
- Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. D., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Letters. 183:191-195.

○ **F**

- Fachini-Queiroz F.C., Kummer R., Estevão-Silva C.F., De Barros Carvalho M.D., Cunha JM., Grespan R., Bersani-Amado C.A., and Nakamura Cuman R.K., 2012. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. Hindawi Publishing Corporation. ID 657026, 10 pages.
- Farmer E.E., Alméras E., Krishnamurthy V., 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. Curr. Opin. Plant Biol., 6, 372-378.
- Felipe A. Beltrán, Acuña A.I., Miró M.P. and Castro M.A., 2012. Brain Energy Metabolism in Health and Disease, Neuroscience - Dealing With Frontiers, Dr. Carlos M. Contreras (Ed.), ISBN: 978-953-51-0207-6.
- Ferraris L, Abbattista Gentile I, Matta A., 1987. Activation of glycosidases as a consequence of infection stress in *Fusarium* wilt of tomato. J Phytopathol 118: 317-325.

- Fonseca, S., Chico, J. M. et Solano, R., 2009. The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology* 12(5):539-547.
- Frost C.J., Mescher M.C., Carlson J.E. and De Moraes C.M., 2008. Plant Defense Priming against Herbivores: Getting Ready for a Different Battle. *Plant Physiology*. vol. 146 no. 3 818-824.

## ○ G

- Ghesten A., Seguin E., Paris M., Orecchioni A.M., 2001. Le préparateur en pharmacie dossier 2 “botanique-pharmacognosie- phytothérapie-homéopathie”. Ed Lavoisier Paris. P: 193-199-206-207.
- Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C. & Salgueiro, L., 2010. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, *Industrial Crops and Products*, Vol. 32, No. 1, (July, 2010), pp. (70-75), ISSN: 0926-6690.
- Grechkin A., 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.*, 37(5), 317-352.
- Guo J, Qi H, Guo Y, Ge H, Gong L, Zhang L and Sun P., 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, **29**, 66-72.

## ○ H

- Hammi A., 2003. Caractérisation De Populations De *Phytophthora Infestans* (Mont.) De Bary Dans La Région De Saïs. Thèse De Doctorat Nationale En Biologie Spécialité: Phytopathologie. Université Sidi Mohammed Ibn Abdallah. Faculté Des Sciences Dhar El Mehraz, FES.
- Hassikou R., Hassikou K., Touhami A.O.& Douira A., 2002. Effet *in vitro* et *in vivo* de quelques fongicides sur *Curvularia lunata*. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)*, Vol. 22 (4).

- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiareddine M., El Mahjoub S., 2005. Effet inhibiteur *in vitro* ET *in vivo* du *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* .f.sp .radicis *lycopersici*. Biotechnol Agron Soc .Environ. 9(3). P: 163-171.
- Hoefle C., Huckelhoven R., 2008. Enemy at the gates: traffic at the plant cell pathogen interface. Cell Microbiol 10: 2400-2407.
- Huckelhoven R., 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. Annu Rev Phytopathol.; 45:101-27.
- Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V., 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol.29: 691-700

## ○ I

- Iserin P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. 2ème Ed. Larousse. Londres Pp : 143 - 225-226.

## ○ J

- Jalloul A., Clerivet A. et Nicole M., 2009. La signalisation hormonale dans la résistance des plantes aux bioagresseurs. Cahiers Agricultures, 18, 493-497.
- Jord'an M.J., Mart'inez R.M., Goodner K.L., Baldwin E.A., Sotomayor J.A., 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products* .(24) 253–263.
- Jordan M.J., Martinez R.M., Mart'inez C., Mon'ino I., Sotomayor J. A., 2009. Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial crops and products* 2 9; 145–153.

- Jourdan E., Ongena M. et Thonart P., 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, v 12 ( 4) : 437-449.
- Jung J., Park M., Park H.J., Shim S.B., Cho Y.H., Kim J., Lee H-S., Ryu D. H., Choi D., Hwang G-S., 2011. <sup>1</sup>HNMR-based metabolic profiling of naproxen-induced toxicity in rats. *Toxicology Letters* 200 ; 1–7.

## ○ **K**

- Kačániová M., Vukovič N., Hleba L., Bobková A., Pavelková A., Rovná K., Arpášová H., 2012. Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum Vulgare* l. and *Thymus Vulgaris* essential oils. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (1) 263-271.
- Kaloustian J., El-Moselhy T. F., Portugal H., 2003. Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta.* 401 : 7786.
- Keefover-Ring K., Thompson J.D. and Linhart Y.B., 2009. Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour Fragr.J.* (www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/ffj.1921.
- Kiggundu K.A. and Okori P., 2013. Reaction of *Musa Balbisiana* to banana bacterial wilt infection. *African Crop Science Journal*, Vol. 21, No. 4, pp. 337 – 346.
- Korth K.L., 2003. Profiling the response of plants to herbivorous insects. *Genome Biol* 4: 221–224.
- Koul O., Walia S. and Dhaliwal G.S., 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.* 4(1): 63–84.
- krebs H., Dorn Brigitte et Forrer H.-R., 2006. lutte contre le mildiou de la pomme de terre avec des préparations à base de plantes. *Revue suisse Agric.* 38 (4) : 203-207.

## ○ L

- Lateur M., 2002. Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépin au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6(2), 67-77.
- Lee K.w., Everts H., Kappert H.J., Wouterse H., Frehner M. and Beynen A.C., 2004. Cinnaman aldehyde, but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose-induced growth depression in female broiler chickens. *Int.J.Poult.Sci.*,3:608-612.
- Lee S-J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K-G., 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91.131–137.
- Lee Y.H., Choi C-W., Kim S.H., Yun J.G., Chang S.W., Kim Y.S. and Hong J.K., 2012. Chemical Pesticides and Plant Essential Oils for Disease Control of Tomato Bacterial Wilt. *Plant Pathol. J.* 28(1): 32-39.
- Le Floch G., Rey P., Déniel F., Benhamou N., Picard K. et Tirilly Y., 2003. Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. *Agronomie*, 23:455-460.
- Leung A.Y., Foster S., 1996. *Encyclopaedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics*, John Wiley & Sons, New York, , p. 492
- Lopez M., Bannenber G., Castresana C., 2008. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Cur Op Plant Biol*; 11: 420:7.
- Lu C., Wang Y., Sheng Z., Liu G., Fu Z., Zhao J., Zhao J., Yan X., Zhu B., Peng S., 2010. NMR-based metabonomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 248; 178-184.
- Lu X., Xiong Z., Li J., Zheng S., Huo T., Li F., 2011. Metabonomic study on “Kidney-yang Deficiency syndrome” and intervention effects of *Rhizoma Drynariae* extracts in rats

using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Talanta* 83; 700-708.

## ○ M

- Mandal S., Mallick N. and Mitra A., 2009. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 642–649.
- Mandal S., Kar I., Mukherjee A.K. and Acharya P., 2013. Elicitor-Induced Defense Responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. *The Scientific World Journal*. Volume, Article ID 561056, 9 pages.
- Manikandan A., Sathiyabama M., 2014. Foliar Application of Salicylic Acid Stimulates Flowering and Induce Defense Related Proteins in Finger Millet Plants. *Universal Journal of Plant Science* 2(1): 14-18, 2014. DOI: 10.13189/ujps.2014.020102.
- Masuta C, Van den Bulcke M, Bauw G, Van Montagu M, Caplan AB., 1991. Differential Effects of Elicitors on the Viability of Rice Suspension Cells. *Plant Physiol.* 97(2):619-629.
- Modarres Najafabadi S.S., Taji M., Hajihassani A., 2012. Study on *Thymus vulgaris*, *Lavandula officinalis* and *Eucalyptus camaldulensis* extracts on the two-spotted spider mite. *International Journal of AgriScience* Vol. 2(3): 228-236.
- Mohammadi S, Aroiee H, Aminifard MH et Jahanbakhsh v., 2012. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against strawberry grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 45, No. 20, 2474–2484.
- Mouaragadja I. et M'batchi B., 1998. Étude et identification de la pourriture de l'oseille de Guinée au Gabon. *Fruits* 53 (1): 57 - 68.
- Morales R., 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme: the genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.

- Moretti D.L., Sanna-Passino G., Demontis S., and Bazzoni E., 2002. Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest Control. *AAPS PharmSciTech*; 3 (2) article 13 (<http://www.aapspharmscitech.org>).
- Morrissey J. P. et Osbourn A. E., 1999. Fungal Resistance to Plant Antibiotics as a Mechanism of Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 708-724.

## ○ N

- Nagy N. E., Franceschi V. R., Solheim H., Krekling T. And Christiansen E., 2000. Wound-induced traumatic resin duct formation in stems of Norway spruce (Pinaceae): anatomy and cytochemical traits. *American Journal of Botany* 87: 302–313.
- Nakaho K, Hibino H, Miyagawa H., 2000. Possible mechanisms limiting movement of *Ralstonia solanacearum* in resistant tomato tissues. *J Phytopathol* 148:181–190.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193pp.
- Neuhoff D., Klinkenberg H. J. & Köpke U., 2003. Nutzung von pflanzeextrakten zur kontrolle der kraufaulen (*P.infestans*) im ökologidchen kartoffelbau. In: Freyer B. (Hrsg.) Tagungsband n°7: ökologischer Landbau der zukunfft.universitat für Bodenkultur, Wien, 559-560.
- Nguéfac J., Leth V., Amvan Zollo P. H. and Mathur S. B., 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp. 329-334.
- Noutoshi Y., Okazaki M., Kida T., Nishina Y., Morishita Y., Ogawa T., Suzuki H., Shibata D., Jikumaru Y., Hanada A., Kamiya Y. and Shirasu K.. 2012. Novel Plant Immune-Priming Compounds Identified via High-Throughput Chemical Screening Target Salicylic Acid Glucosyltransferases in Arabidopsis. *Plant cell*. DOI 10.1105/tpc.112.098343.

○ **O**

- Okokon J.E., Nwafor P.A. and Ekpo M.D., 2010. Subchronic toxicity studies of the ethanolic root extract of *Croton Zambesicus*. Pak. J. Pharm. Sci., Vol.23, No.2, pp.160-169.
- Ozcan M, Chalchat JC., 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. Bulg. J. Plant Physiol. 30(3-4): 68-73
- Özkan A., Erdoğan A., 2011. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. Turk J Biol, 35 ; 735 -742
- Ozturk M., Uysal I., Gücel S., Mert T., Akcicek E. And Celik S., 2008. Ethnoecology of poisonous plants of turkey and northern cyprus. Pak. J. Bot., 40(4): 1359-1386.

○ **P**

- Pajot E, Maurice S, Guerrand J, Chirapongsatunkul N, Ruffray P, Kauffmann S, Maxant F-X et Mérac H., 2007. TTF5, fertilisant pouvant stimuler des défenses naturelles de plantes contre des pathogènes sur tabac, fraise et vigne : travaux sur un mélange. Phytoma . La Défense des Végétaux, N°603.
- Pajot E & Regnault-Roger C., 2008. Stimulation des défenses naturelles des plantes et résistance induite: une nouvelle stratégie phytosanitaire? In Biopesticides d'origine vegetal, 2nde édition. Tec & Doc Lavoisier, Paris
- Pare´ P-W., Farag M.A., Krishnamachari V., Zhang H., Ryu C.-M. & Kloepper J.W., 2005. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. Photosynthesis Research 85: 149–159.
- Pariente L., 2001. Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2<sup>ème</sup> Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p.

- Pattnaik S., Subramanyam V.R. and Kole C.R., 1996. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils In vitro. *Microbios.*, 86: 237-246.
- Piasentin J., 2010. Produits naturels en protection des cultures. Potentiel d'utilisation des plantes à parfum, aromatiques et médicinales. *Terres D'innovation*, vol. , p. 1-87.
- Pieterse C., Schaller A., Mauch-Mani B., and Conrath U., 2006. *Signaling in Plant Resistance Responses: Divergence and Cross-Talk of Defense Pathways*, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Plodpai P., Chuenchitt S., Petcharat V., Chakthong S., Voravuthikunchai S. P., 2013. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. *Crop Protection* 43: 65-71.
- Proestos C., Lytoudi K., Mavromelanidou O.K., Zoumpoulakis P. and Sinanoglou V.J., 2013. Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils. *Antioxidants* , 2, 11-22; doi:10.3390/antiox2010011.

## ○ R

- Ramírez-Suero M., 2009. Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. Thèse de doctorat en Interactions Plantes-Microorganismes. Institut national polytechnique de Toulouse. 273p.
- Rasooli I., Bagher R.M., Allameh A., 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus Niger* by essential oils from *Thymus Eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. *Food Control*. **17**, 359-364.
- Reddy M.V. B., Angers P., Gosselin A., Arul J., 1998 .Antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil. *Phytochemistry*. 47 (8) : 1515-1520.
- Regnault-Roger C, Ribodeau M, Hamraoui A, Bareau I, Blanchard P, Gil MI , Tomas Barberan F., 2004. Disturbance of *Acanthoscelides obtectus*” (Bruchidae, Coleoptera)

behaviour by polyphenolic compounds identified in insecticidal Labiatae botanicals. *Journal of Stored Product Research*, 40: 395-408.

- Ryan Clarence A., 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1477, no. 1-2, p. 112-121.

## ○ S

- Sakr S.A. and Al-Amoudi W.M., 2012. Effect of leave extract of *Ocimum basilicum* on deltamethrin induced nephrotoxicity and oxidativ stress in albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (05); 2012: 22-27.
- Salgado-Siclán ML, Rojas-Martínez R, Zavaleta-Mejía E, Ochoa-Martínez D, Burgueño-Ferreira J, et al., 2012. Differential Accumulation of Defense-Related Transcripts by Inducers of Resistance in *Arabidopsis*. *J Plant Pathol Microb* 3:137. DOI:10.4172/2157-7471.1000137.
- Sasaki-Sekimoto Y., Taki N., Obayashi T., Aono M., Matsumoto F., Sakurai N., Suzuki H., Hirai M.Y., Noji M. et al., 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44: 653-668.
- Schoonen, W.G.E.J., Kloks, C.P.A.M., Ploemen, J.-P.H.T.M., Horbach, G.J., Smit, M.J., Zandberg, P., Mellema, J.-R., Thijssen-van Zuylen, C., Tas, A.C., van Nesselrooij, J.H.J., Vogels, J.T.W.E., 2007. Sensitivity of 1H NMR analysis of rat urine in relation to toxico metabonomics. Part I: dose-dependent toxic effects of bromobenzene andparacetamol. *Toxicol. Sci.* 98; 271–285.
- Senatore, F., 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential Oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food Chem.* 44, 1327–1332.
- Sivachandran M and P Hariharan, 2012. Renoprotective effect of *Terminalia chebula* on gentamicin induced toxicity in rats. *Inter J Vet Sci*, 1(2): 76-79.

- Shah J., 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant biology*. 6 : 365-371.
- Shalaby S-E. M., Magd Eldin M., Abo-donia S-A., Mettwally M., Attia Z.A., 2011. Toxicological affects of essential oils form Eucalyptus globules and clove *Eugenia caryophyllus* on albino rats. *Polish J. of Environ. Stud. Vol.20, No.2, 429-434*.
- Shockcor J.P. and Holmes E., 2002 .Metabonomic Applications in Toxicity Screening and Disease Diagnosis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 35-51.

## ○ T

- Tarayre M., Thompson J.D., Escarré J. & Linhart Y.B., 1995. Intra-specific variation in the inhibitory effects of *Thymus vulgaris* (Labiatae) monoterpenes on seed germination - *Oecologia* 101: 110-118.
- Tapwal A., Nisha; Garg S., Gautam N.; Kumar R., 2011. *In Vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Braz. arch. biol. technol.* vol.54 no.6 Curitiba Nov./Dec.
- Thaler J.S., 1999. Induced resistance in agricultural crops: effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato plants. *Environmental Entomology*, 28:30.
- Thuille N., Fille M., Nagl M., 2003 .Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health*. 206 : 217-221.
- Tripathi A. K., Shikha Upadhyay, Mantu Bhuiyan and P. R. Bhattacharya, 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* Vol. 1(5) pp. 052-063.
- Turner M., 2009. Plusieurs niveaux de contrôle sont mis en jeu lors du flétrissement bactérien chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, France (SEVAB). P122.

## ○ U

- Uma B., Rani, T. S. et Podile, A. R., 2011. Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology* 168(18): 2141-2152.

## ○ V

- Vagelas A., Pachatzis H. and Wogiatzi E., 2009. Biological control of *Botrytis cinerea* fruit rot (Gray mold) on strawberry and red pepper by olive oil mill wastewater. *Biotechnol and Biotechnol Journal*. EQ.23(4), 1489-1491.
- Van Loon LC., 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol.* 4:111-116.
- Van Loon, L. C. and Van Strien, E. A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Mol. plant Pathol.* 55(2):85-97.
- Van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135–162.
- Van Hulten M. et al., 2006. Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**(14), 5602-5607.
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 895-908.
- Vouillamoz JF., Schaller M., Rossinelli M., Carron C-A et Carlen C., 2011. Varico 3', nouvel hybride de thym (*Thymus vulgaris* L.) pour la production en Suisse. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture* | V 370 ol. 43 (6): 370–376.

## ○ W

- Waliwitiya R., Belton P., Nicholson R.A and Lowenberger C.A., 2009. Effects of the essential oil constituent thymol and other neuroactive chemicals on flight motor activity and wing beat frequency in the blowfly *Phaenicia sericata*. ([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)) DOI 10.1002/ps.1871.
- Wang H.-P., Liang Y.-J., Zhang Q., Long D.-X., Li W., Li L., Yang L., Yan X.Z., Wu Y.-J., 2011. Changes in metabolic profiles of urine from rats following chronic exposure to anticholinesterase pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101; 232–239.
- Want E.-J., Masson P., Michopoulos F., Wilso I.D.n, Theodoridis G., Plum R.S b., Shockcor J., Loftus N., Holmes E. & Nicholson J.K., 2013. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nature Protocols* 8, 17–32
- Wasternack C, Stenzel I, Hause B, Hause G, Kutter C, Maucher H, Neumerkel J, Feussner I, Miersch O., 2006. The wound response in tomato—role of jasmonic acid. *J Plant Physiol* 163:297–306.
- Weber H., 2002. Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.*, 7(5), 217-224.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565.
- Woo S.L.; Zoina, A.; Sorbo, G.; Lorito, M.D.; Scala, N.B.F. and Noviello, C., 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum f.sp. phaseoli* by pathogenic races, VCGs, RFLPs, and RAPD. *Phytopathology*, 86: 966-973.
- Wydra K, Beri H., 2006. Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *R. solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 41-50.

○ **Y**

- Yadav S., Tomar A.K., Yadav R.N. and Yadav S., 2013. Screening of Antifungal Proteins from Plants of Cucurbitaceae family against *Fusarium oxysporum*: Potential as Biofungicides. Int. Res. J. Environment Sci., Vol. 2(6), 91-96

○ **Z**

- Zhang A., Sun H., Wang P., Han y., Wang X., 2012. Metabonomics for discovering biomarkers of hepatotoxicity and nephrotoxicity. Pharmazie. Vol 20;67 (2):99-105.
- Zuppi C, Messana I, Forni F, Rossi C, Pennacchietti L, Ferrari F, et al., 1997. <sup>1</sup>H NMR spectra of normal urines: reference ranges of the major metabolites. Clin Chim Acta.265:85-97.

# ANNEXES

# ANNEXE I

## MILIEUX DE CULTURE

### MILIEU PDA

---

Pomme de terre	200 g
Dextrose	20 g
Agar-agar	15 g
Eau distillée q.s.p.	1000ml

---

### MILIEU AU PETIT POIS (milieu pour *Phytophthora*)

---

petit pois de conserve gélosé	140 g
Agar-agar	16 g
Eau distillée stérile q.s.p.	1000 ml

---

### MILIEU V8 (milieu pour *Phytophthora*)

---

cocktail de légumes V8	200 ml
CaCo <sub>3</sub>	3g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

---

# ANNEXE II

## MINIGELS BIORAD ACRYLAMIDE 15% SDS

### 1 GEL DE SEPARATION

Pour 4 gels de 1mm épaisseur (minigels classiques)

- Acrylamide 30% / bis-acrylamide 0.8%	12ml
- Tris HCl 1,5M pH 8,8	6 ml
- H2O	6 ml
- SDS 10%	240µl
- Persulfate NH4 10%	240µl
- Temed	24µl

### GEL DE CONCENTRATION

- Acrylamide 30% / bis-acrylamide 0,8%	1,6ml
- Tris 0,5M pH 6,8	2,5ml
- H2O	5.9ml
- SDS 10%	100µl
- Persulfate 10%	100µl
- Temed	10µl

### TAMPON CUVE

- Tris	3g
- Glycine	14.4g
- SDS	1g
- H2O	1000ml

### TAMPON TRANSFERT

- Tris	3g
- Glycine	14.4g
- H2O	800ml
- Méthanol	200ml

## COLORATION GELS

30mg/100ml de bleu de Coomassie dans: Méthanol (5 volumes), Acide acétique (1 volume), H<sub>2</sub>O (5 volumes)

Décoloration: même tampon sans bleu.

Fixation: H<sub>2</sub>O 7% acide acétique

## BLEU DE DEPOT

- Glycérol	500µl
- SDS 10%	500µl
- β-mercaptoéthanol 50%	500µl
- Bleu de bromophénol 0,05%	250µl
- Tampon cuve	3,25ml

## MIGRATION

20 mA constants par plaque, environ 1h30 pour un gel de 0,75mm d'épaisseur

### Coloration des gels de polyacrylamides à l'argent

#### 1. SOLVANT :

A : 50 % méthanol, 12 % acide acétique ( 100 mL MeOH 24 mL acide acétique à 200 mL d'eau.

B : 50 % éthanol

C : 40 mg sodiumthiosulfate ( Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ) à 200 mL d'eau ( préparé extemporanément )

D : 0,4 g de nitrate d'argent ( AgNO<sub>3</sub> ), 150 µL formaldéhyde à 200 mL d'eau ( préparé extemporanément )

E : 12 g de carbonate de sodium ( Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ), 100 µL de formaldéhyde plus un petit grain de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( 0,8 mg ) à 200 mL d'eau ( préparé extemporanément )

# ANNEXE III

## Histologie

### 1- Le prélèvement :

Pratiqué immédiatement après la mort, les pièces sont portés immédiatement dans un volume suffisant de liquide fixateur.



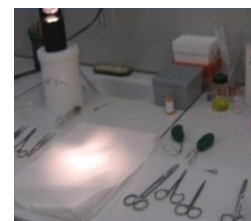
### 2- La fixation :

Consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenus dans les lysosomes cellulaires. Le liquide fixateur utilisé est le Bouin (Formol+acide picrique).



### 3- Inclusion :

Les pièces fixées sont déshydratées dans des bains d'alcool, celui-ci est remplacé avant l'inclusion par le xylène ; qui est un liquide intermédiaire miscible à l'alcool et à la paraffine



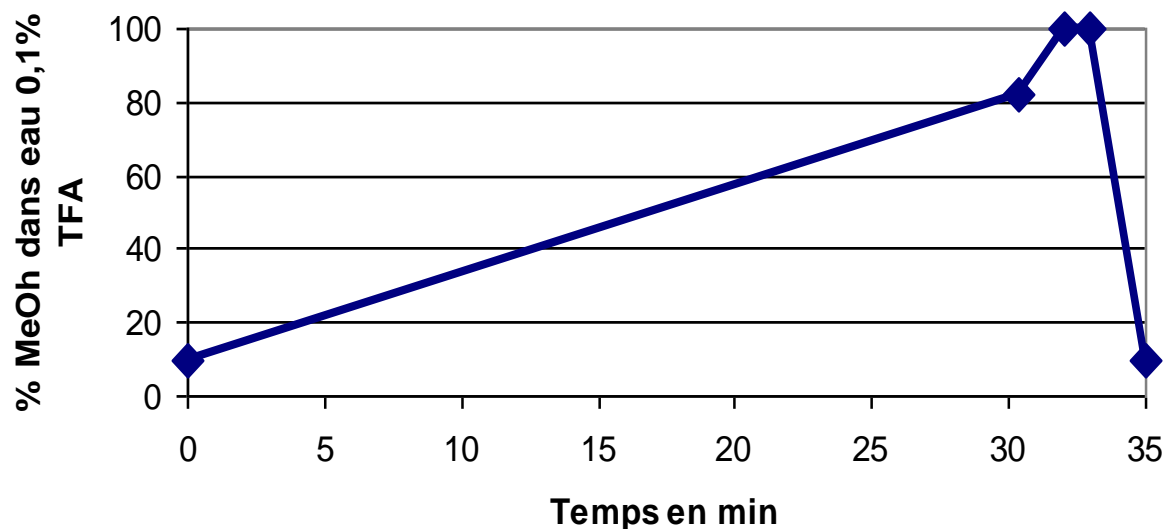
### 4- Confection des coupes (microtome)



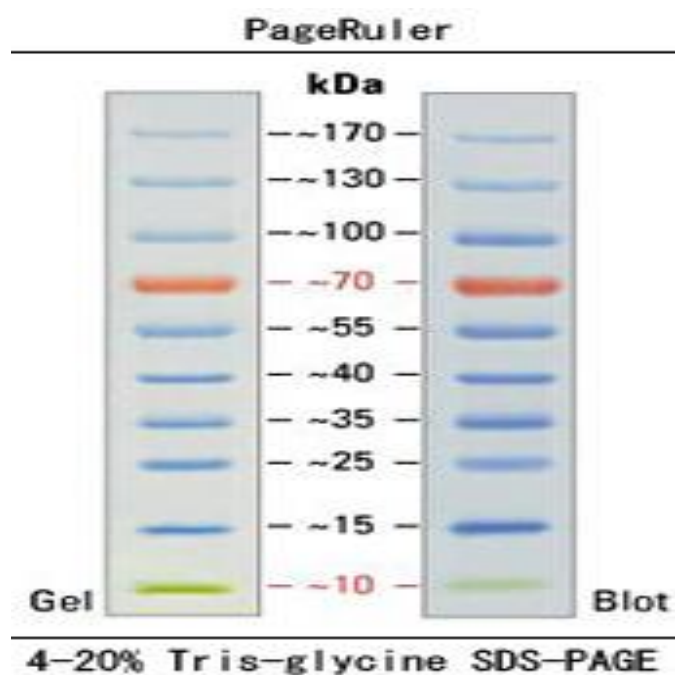
## ANNEXE IV

Analyse HPLC de l'extrait hydroalcoolique du thym

### Gradient de MeOH



References pour la lecture des gels SDS-PAGE et western blot



# ANNEXE V

## Analyse Statistique

### Partie I. Efficacite des extraits

#### 1. Tets d'efficaité:

a. Inhibition de la croissance mycélienne de l'huile essentielle :

Variable : Pi% cr.my HE

ANALYSE DE VARIANCE								
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.	
VAR.TOTALE	203900,3	119	1713,448					
VAR.FACTEUR 1	8342,063	4	2085,516	1398,111	0			
VAR.FACTEUR 2	145746,5	5	29149,3	19541,43	0			
VAR.INTER F1*2	49677,44	20	2483,872	1665,165	0			
VAR.RESIDUELLE 1	134,25	90	1.1.1 1,492	1.1.2	1.1.3	1.1.4 1,221	1.1.5	1,62%

b. Inhibition de la sporulation de l'huile essentielle :

Variable : Pi% SP HE

ANALYSE DE VARIANCE								
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.	
VAR.TOTALE	67047,22	39	1719,159					
VAR.FACTEUR 1	54073,27	4	13518,32	952,396	0			
VAR.FACTEUR 2	4416,309	1	4416,309	311,139	0			
VAR.INTER F1*2	8131,824	4	2032,956	143,226	0			
VAR.RESIDUELLE 1	425,82	30	14,194			3,767	5,89%	

c. Inhibition de la croissance mycélienne de l'extrait polyphénolique :

Variable : TI%cr.my EPP

ANALYSE DE VARIANCE							
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	303291,3	143	2120,918				
VAR.FACTEUR 1	108451,5	5	21690,29	93,702	0		
VAR.FACTEUR 2	136621,8	5	27324,37	118,041	0		
VAR.INTER F1*2	33217,95	25	1328,718	5,74	0		
VAR.RESIDUELLE 1	25000	108	231,482			15,215	21,87%

d. Inhibition de la sporulation de l'extrait polyphénolique :

Variable : TI%SP EPP

ANALYSE DE VARIANCE							
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	42064,07	29	1450,485				
VAR.FACTEUR 1	38996	4	9748,999	68,242	0		
VAR.FACTEUR 2	3,605	1	3,605	0,025	0,86996		
VAR.INTER F1*2	207,273	4	51,818	0,363	0,83319		
VAR.RESIDUELLE 1	2857,191	20	142,86			11,952	18,52%

e. Traitement sur feuilles detaches:

Variable : durée après traitement

ANALYSE DE VARIANCE	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1,36E+11	8	1,7023E+10				
VAR.FACTEUR 1	6,85E+10	2	3,4261E+10	3,038	0,122		
VAR.RESIDUELLE 1	6,76E+10	6	1,1278E+10			106196,05	67,91%

## Partie III. Prospection de la toxicite des extraits

### 2. Chimie Clinique de l'urine des rats traités:

#### LIVER-1

Variable : T pro

ANALYSE DE VARIANCE							
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1,362	11	0,124				
VAR.FACTEUR 1	0,149	3	0,05	0,328	0,80687		
VAR.RESIDUELLE 1	1,213	8	0,152			0,389	8,33%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

Variable : alb

ANALYSE DE VARIANCE		1.1.10 1.1.11 1.1.12 1.1.13 1.1.14					
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1,092	11	0,099				
VAR.FACTEUR 1	0,641	3	0,214	3,782	0,05875		
VAR.RESIDUELLE 1	0,452	8	0,056			0,238	7,21%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

Variable : t.bil

ANALYSE DE VARIANCE		1.1.15 1.1.16 1.1.17 1.1.18 1.1.19					
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,167	11	0,015				
VAR.FACTEUR 1	0,087	3	0,029	2,889	0,102		
VAR.RESIDUELLE 1	0,08	8	0,01			0,1	15,00%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

Variable : GoT

ANALYSE DE VARIANCE		1.1.20 1.1.21 1.1.22 1.1.23 1.1.24					
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	17125,73	11	1556,885				
VAR.FACTEUR 1	4567,23	3	1522,41	0,97	0,45446		
VAR.RESIDUELLE 1	12558,5	8	1569,813			39,621	42,36%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

## Variable : GPT

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.25	1.1.26	1.1.27	1.1.28	1.1.29
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	20633,73	11	1875,793				
VAR.FACTEUR 1	18036,56	3	6012,188	18,519	0,00074		
VAR.RESIDUELLE 1	2597,166	8	324,646			18,018	25,45%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

## Variable : LDH

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.30	1.1.31	1.1.32	1.1.33	1.1.34
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1272095	11	115645				
VAR.FACTEUR 1	545214,3	3	181738,1	2	0,19218		
VAR.RESIDUELLE 1	726880,6	8	90860,08			301,43	40,29%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

---



---

**KIDNEY-2**


---

## Variable : T. PRO2

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.35	1.1.36	1.1.37	1.1.38	1.1.39
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1,622	11	0,147				
VAR.FACTEUR 1	0,304	3	0,101	0,615	0,62679		
VAR.RESIDUELLE 1	1,318	8	0,165			0,406	8,83%

## Variable : ALB2

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.40	1.1.41	1.1.42	1.1.43	1.1.44
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1,817	11	0,165				
VAR.FACTEUR 1	1,272	3	0,424	6,225	0,01769		
VAR.RESIDUELLE 1	0,545	8	0,068			0,261	7,72%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

## Variable : BUN

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.45	1.1.46	1.1.47	1.1.48	1.1.49
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	742,729	11	67,521				
VAR.FACTEUR 1	470,229	3	156,743	4,602	0,03761		
VAR.RESIDUELLE 1	272,5	8	34,063			5,836	35,28%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

## Effet Extrait polyphenolique

## LIVER-1

## Variable : T pro

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.50	1.1.51	1.1.52	1.1.53	1.1.54
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,913	5	0,183				
VAR.FACTEUR 1	0,203	2	0,102	0,43	0,68658		
VAR.RESIDUELLE 1	0,71	3	0,237			0,486	9,60%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

## Variable : alb

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.55	1.1.56	1.1.57	1.1.58	1.1.59
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,453	5	0,091				
VAR.FACTEUR 1	0,063	2	0,032	0,244	0,79789		
VAR.RESIDUELLE 1	0,39	3	0,13			0,361	10,50%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

## Variable : t.bil

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.60	1.1.61	1.1.62	1.1.63	1.1.64
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,86	5	0,172				
VAR.FACTEUR 1	0,31	2	0,155	0,845	0,51265		
VAR.RESIDUELLE 1	0,55	3	0,183			0,428	53,52%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

**Variable : GDP**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.65	1.1.66	1.1.67	1.1.68	1.1.69
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	2282,833	5	456,567				
VAR.FACTEUR 1	120,334	2	60,167	0,083	0,92164		
VAR.RESIDUELLE 1	2162,5	3	720,833			26,848	29,13%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

**Variable : GPT**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.70	1.1.71	1.1.72	1.1.73	1.1.74
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	2953,333	5	590,667				
VAR.FACTEUR 1	1029,333	2	514,667	0,802	0,5271		
VAR.RESIDUELLE 1	1924	3	641,333			25,325	43,41%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

**Variable : LDH**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.75	1.1.76	1.1.77	1.1.78	1.1.79
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1739991	5	347998,3				
VAR.FACTEUR 1	1685732	2	842866,2	46,602	0,00495		
VAR.RESIDUELLE 1	54259	3	18086,33			134,485	11,44%

TEST DE NEWMAN-KEULS - SEUIL = 5%

**KIDNEY-2****Variable : T.PRO2**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.80	1.1.81	1.1.82	1.1.83	1.1.84
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,593	5	0,119				
VAR.FACTEUR 1	0,213	2	0,107	0,842	0,51375		
VAR.RESIDUELLE 1	0,38	3	0,127			0,356	7,07%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

**Variable : ALB2**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.85	1.1.86	1.1.87	1.1.88	1.1.89
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	0,308	5	0,062				
VAR.FACTEUR 1	0,213	2	0,107	3,368	0,17116		
VAR.RESIDUELLE 1	0,095	3	0,032			0,178	4,97%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

**Variable : BUN**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.90	1.1.91	1.1.92	1.1.93	1.1.94
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1390,833	5	278,167				
VAR.FACTEUR 1	620,333	2	310,167	1,208	0,41296		
VAR.RESIDUELLE 1	770,5	3	256,833			16,026	83,61%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

**Variable : UA**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.95	1.1.96	1.1.97	1.1.98	1.1.99
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	3,313	5	0,663				
VAR.FACTEUR 1	0,653	2	0,327	0,368	0,72022		
VAR.RESIDUELLE 1	2,66	3	0,887			0,942	20,62%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

**Variable : CRE**

ANALYSE DE VARIANCE			1.1.100	1.1.101	1.1.102	1.1.103	1.1.104
	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	2,908	5	0,582				
VAR.FACTEUR 1	0,423	2	0,212	0,256	0,78987		
VAR.RESIDUELLE 1	2,485	3	0,828			0,91	45,89%

TEST DE NEWMAN KEULS NON SIGNIFICATIF

# Article

F. Benourad, Z. Kahvecioglu, M. Youcef-Benkada and J-M Colet

Prospective evaluation of potential toxicity of repeated doses of *Thymus vulgaris* L. extracts in rats by means of clinical chemistry, histopathology and NMR-based metabonomic approach

