

Les huiles essentielles ont été introduites dans le quotidien des ménages à des fins thérapeutiques depuis le premier millénaire, mais leur utilisation dans le domaine agroalimentaire est très récente. Ce sont des concentrés de molécules extraites à partir de plantes, le plus souvent par hydrodistillation. Par leur constitution chimique qui leur permet d'entrer en réaction avec d'autres molécules, dont celles constituant les organismes biologiques (parois, membranes, contenu cellulaire), elles ont des propriétés chimiques (pH, corrosivité), physiques (densité, indice de réfraction) et biologiques (comme leurs propriétés insecticides, antimicrobienne, antifongique mais aussi antioxydant et antiradicalaire) qui peuvent être exploitées dans la lutte contre le rancissement des produits alimentaires (Adorjan and Buchbauer, 2010). Leur origine biologique et leur biodégradabilité ont conduit à l'essor de leur utilisation dans le domaine agroalimentaire (Sharma and Pongener, 2010).

De nombreuses recherches ont axé leur intérêt sur la mise en valeur des HE dans le domaine thérapeutique et alimentaire. La capacité des huiles essentielles à stimuler ou à inhiber les organismes antagonistes des intérêts humains a été étudiée- in vitro comme in vivo. Dans la protection des denrées alimentaires, les conditions dans lesquelles elles peuvent être utilisées ont été évaluées sur de nombreuses espèces dont les fruits que ce soit au champ ou au stade post-récolte (Dayan et al., 2009). Par contact direct ou par diffusion dans l'air, les HE diffusent à travers les stomates et la paroi cellulaire et interagissent avec le contenu cellulaire (Lara et al., 2014). Il en résulte parfois, une perturbation, pouvant conduire à la mort de l'organisme hôte, des réactions métaboliques et des processus biologiques, telle la respiration. Au même titre que certaines bactéries antagonistes des champignons phytopathogènes des fruits (Ramanujam et al., 2012), certaines HE ont aussi la capacité d'élucider les mécanismes de résistance interne du fruit, en stimulant la synthèse des composés phénoliques, dont les acides phénoliques et les résorcinols pour les mangues, ainsi que l'activité des enzymes liés à la défense contre les attaques pathogènes comme la chitinase, la phénylalanine-amonia-lyase, la glucanase pour les fruits en général (González-Aguilar et al., 2007; Karunanayake et al., 2011). En effet, des études ont suggéré qu'elles peuvent stimuler la synthèse de composés phénoliques (Lattanzio et al., 1994) et des composés chitinolytiques (Herrera-Estrella and Chet, 1999) qui ont des rôles protecteurs contre les champignons phytopathogènes et les dégâts causés par ces derniers au niveau membranaire mais aussi au niveau intracellulaire. En effet, la membrane cellulaire a une composition variable de chitine, cellulose, glucane (polymère glucidique), lipide et protéine en fonction du groupe de champignons (Webster and Weber, 2007). En interagissant avec le contenu cellulaire, les HE peuvent influencer les traits biochimiques, physiques et même organoleptiques des fruits. En

effet, des facteurs comme la respiration, l'acidité, la couleur, la teneur en sucre sont déterminants pour le parfum, le goût et même la fermeté, qui sont des éléments clé de la conservation post-récolte et du commerce des fruits (Irtwange, 2006; Rahul et *al.*, 2015).

D'autres recherches ont révélé qu'elles agissent à travers les molécules biologiquement actives qu'elles contiennent. En fonction de la nature de chacun de ces molécules et de leur proportion dans l'HE, une molécule peut être le seul principe actif de cette dernière. Son activité peut être stimulée par les autres composants de l'HE (les composants mineurs) et leurs activités s'ajoutent de façon synergique, ou diminuent par leur action antagoniste (Burt, 2004). Selon que la fongitoxité d'une HE découle d'un principe actif ou non, elle peut être étendue à d'autres HE ayant des compositions analogues.

Dans la recherche d'alternatifs biologiques des fongicides commerciaux, il devient par conséquent important de connaître la composition chimique des produits utilisés, de comprendre comment ces produits agissent sur l'organisme cible, à savoir le pathogène ; mais aussi sur l'organisme que l'on cherche à protéger, à savoir les fruits. Ces HE agissent –t-elles sur le système de défense interne du fruit, sur les processus métaboliques de ce dernier à travers un principe actif, ou, ces molécules interagissent –t- elles entre elles pour engendrer ces activités ?

Cette partie de nos recherches doctorales part de l'hypothèse que les traitements fongicides à bases d'HE issues de la biodiversité malgache, utilisés dans la précédente partie, élicitent aussi les molécules précurseurs de la défense au sein de la peau du fruit (H1), sans altérer les processus métaboliques et biochimiques au sein de la pulpe (H2) et ce, par l'intermédiaire d'un principe actif qui est le composant majeur de l'HE (H3). Pour répondre à ces questions et tester nos hypothèses :

- les peaux des mangues réunionnaises traitées avec l'HE la plus fongicide ont été analysées par rapport à leurs activités chitinase, phénylalanine-ammonia-lyase et teneur en résorcinol,
- les pulpes de tous les fruits ont été analysées par rapport à leurs couleurs, acidités titrables, pH et teneurs en sucres solubles,
- la composition chimique de toutes les HE a été déterminée,
- la fongitoxité in vitro et la fongitoxité in vivo du composant majeur de l'HE la plus fongicide ont été déterminées et comparées avec celles de cette dernière. Une comparaison entre les effets de ce composant et ceux de l'HE sur l'activité chitinase, phénylalanine-ammonia-lyase teneur en résorcinol de la peau des mangues réunionnaises

traitées avec ces deux produits ainsi que la couleur, l'acidité titrable, le pH et la teneur en sucres solubles de la pulpe des fruits traités des mêmes manières, a été effectuée.

I. Approche méthodologique

Cette partie de l'étude a été réalisée à la fois dans l'unité de Microbiologie du Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université d'Antananarivo ainsi que dans le laboratoire de Microbiologie de l'UMR Qualisud du Cirad Reunion - Station Ligne Paradis.

1. Evaluation des effets du traitement sur les processus physiologiques au sein du fruit

a. Principe

Il s'agit de traiter les fruits à l'HE et de voir si le traitement a un effet sur les processus physiologiques internes du fruit, à travers les indicateurs biochimiques de la peau et la pulpe. La teneur en molécules fongicides au niveau de la peau des fruits est évaluée dans la mesure où les principaux mécanismes de défenses des fruits contre les champignons phytopathogènes sont : la synthèse de molécules à activités parolytiques (dont la chitinase qui catalyse la dégradation de la chitine composant les parois des champignons) (Herrera-Estrella and Chet, 1999) ainsi que la synthèse de composés phénoliques qui est catalysée par l'enzyme phényl-ammonia lyase (PAL) (Hahlbrock and Scheel, 1989; Iriti and Faoro, 2009) et ces mécanismes de défenses sont localisés au niveau de la peau. Les effets des traitements sur les différentes propriétés biochimiques de la pulpe sont aussi évalués pour mettre en évidence d'éventuels impacts du traitement sur les mécanismes physiologiques au sein même du fruit et donc sur la qualité de ce dernier.

b. Modèle

Le modèle d'étude est constitué de :

3HE : à savoir les HE de ravensare, l'HE de girofles de Madagascar et l'HE de menthe synthétisée par Xeda internationale.

2 volumes d'HE: 250, 500µL

2 zones géographiques : Ile de la Réunion, Madagascar

4 pathogènes : *Fusarium sp.* isolée à partir de bananes malgaches, *Fusarium sp.* isolée à partir de papayes malgaches, *Fusarium sp.* isolée à partir de mangues malgaches et *Colletotrichum asianum* isolée à partir de mangues (collection privée de l'Université catholique de Louvain)

3 fruits : *Musa acuminata* (bananes malgaches), *Carica papaya* Var. Solo (papayes malgaches), *Mangifera indica* Var. Diego (mangues malgaches) et Var. Cogshall (mangues réunionnaises)

c. Dispositif expérimental

i. Préparation des fruits

Les fruits sont d'abord nettoyés à l'eau courante, puis stérilisés à l'alcool avant d'être séchés à l'air libre. Ils sont ensuite numérotés, pesés, la couleur initiale est mesurée par traitement d'image ou avec un chromamètre.

ii. Echantillonnage

Avant l'expérience (temps T₀), cinq fruits sont :

- pesés
- leurs pulpes et peaux sont découpées, photographiées, pesées, emballées dans du papier aluminium puis plongées 5 minutes dans de l'azote liquide, sorties de l'aluminium et mixées jusqu'à obtention d'une poudre sèche qui se conserve à -80°C dans un flacon de 40mL, en prenant soin de faire un flacon pulpe et deux flacons peau (l'un sera lyophilisé et l'autre non).

iii. Traitement

L'intérieur de deux caissons est recouvert avec du papier aluminium afin de limiter l'imprégnation d'HE. Dix fruits sont ensuite déposés dans ces deux caissons. 500mL d'HE est alors pulvérisé à l'intérieur de l'un des caissons. Enfin, les caissons sont refermés et le tout est incubé dans une chambre froide à 20°C pendant X jours avant de retirer le revêtement en aluminium. X est le délai maximum d'incubation des fruits avec les HE sans endommager ces derniers. A l'exception de l'HE de ravensare type MC pour laquelle X=1h, X=1j pour toutes les HE. L'expérience est arrêtée quand les fruits ont atteint leur maturité maximale (environ deux semaines après le début de l'expérience). Un échantillonnage de cinq fruits est effectué après l'incubation (T₁) et en fin de maturation des fruits (T_f). Faute de moyens, cet échantillonnage final T_f est estimé visuellement. Il est de 7 à 10 jours après l'arrivée des fruits (T₀) pour les fruits malgaches et 10 à 15 jours après l'arrivée des fruits pour les mangues réunionnaises.

d. Analyse des échantillons

L'analyse de l'activité PAL, de l'activité chitinase et de la teneur en résorcinol concerne uniquement les peaux de mangues réunionnaises tandis que la mesure des propriétés biochimiques a été effectuée sur les pulpes de tous les fruits.

i. L'activité Phénylalanine– Ammonia - Liase

L'activité PAL induite par les traitements effectués au niveau de la peau des fruits est évalué en ajoutant 0.25g de peau lyophilisée à de 1.5mL de tampon borate béta-mercaptoethanol 0.1M [pH 8.6 : 4.828mg de $B_4Na_2O_7(10H_2O)$ dissouts dans 100mL de H_2O ultra pure (au bain ultrason)+20mL de HCl 0.5N+43 μ L de béta-mercaptoethanol] ainsi que de 0.05g de polyvinylpyrrolidone (PVPP). L'ensemble est homogénéisé au vortex puis centrifugé à 12000g pendant 20mn et à 4°C. 200 μ L de surnageant est ensuite ajouté à 0.05g de PVPP, 160 μ L de phénylalanine et 600 μ L de tampon borate béta-mercapthoethanol. Le mix est incubé 1h à 30°C au bout duquel la réaction est stoppée avec 160 μ L d'acide trichloracétique 28%. L'ensemble est incubé 5min pour précipiter les protéines avec l'acide avant de centrifuger 20min à 12000g et 4°C. La mesure est ensuite effectuée à 290nm avec 200 μ L par microplaque sur un lecteur de plaque en quartz.

ii. L'activité chitinase

0.2g de peau lyophilisé sont ajoutés à 2mL de tampon Sodium acétate 50mM [(pH 5.0 : 29.6mL de A+70.4mL de B, A : 100mL (2.889 mL d'Acide acétique + Eau ultrapure), B : 100mL (4.1015g d'acétate de Sodium, Poids moléculaire 82.03 + Eau ultrapure)]. L'ensemble est centrifugé à 12000g pendant 5 à 10mn et à 4°C. La chitinase n'étant pas soluble, elle doit être resuspendue dans le tube par vortex pour obtenir une suspension représentative de l'échantillon. 600 μ L de cette suspension est ensuite ajouté de 125 μ L de chitine azure 2% (50mL de tampon sodium acétate 50mM + 1g de chitine azure). La réaction est stoppée avec 25 μ L de HCl 1M avant de centrifuger l'ensemble 5min à 12000g et 4°C. La mesure est ensuite effectuée à 550nm avec 200 μ L par microplaque sur un lecteur de plaque Biotek Powerwave HT.

iii. La teneur en résorcinol

La mesure de la teneur en résorcinol a été effectuée uniquement pour la peau de mangues réunionnaises. La méthodologie adoptée est adaptée de la méthode de Knodler et *al.* (2009). 0,5g de peau lyophilisée sont épuisés deux fois dans 10 ml de dichlorométhane au bain à ultrason 80% pendant 1h. Chacun des épuisements est centrifugé 10min à 3480g. La filtration des deux épuisements est faite sur Büchner et filtre wattman n°41. La somme des deux épuisements est évaporée à sec avec un évaporateur rotatif (30°C max) et est reprise dans 10ml de méthanol. Cette aliquote est filtrée à la seringue sur filtre 22µm PTFE avant injection dans l'HPLC. 20µl sont injectés dans la colonne RP18 avec le programme présenté dans le tableau 7 sachant que la barrette de diodes doit analyser de 20 à 600 nm. Les résorcinols ont un maximum d'absorption à 275 nm.

Tableau 7: Programmation du HPLC pour la mesure de la teneur en résorcinol

Débit (ml/mn)	Colonne A	Colonne B	Temps (mn)
	Méthanol	eau	
0,6	83	17	0
0,6	91	9	20
0,6	91	9	30
0,6	100	0	35
0,6	100	0	50
0,6	83	17	51
0,6	83	17	55

iv. Propriétés biochimiques de la pulpe

La couleur de la pulpe est caractérisée avec la luminance (un paramètre tenant compte des trois valeurs caractéristiques de la couleur soit les valeurs rouge vert bleu (RVB), $Luminance = 0.299R + 0.587V + 0.114B$). Celle-ci est extraite avec le logiciel ImageJ pour les fruits malgaches et calculée à partir des valeurs L^*, a^*, b^* mesurées avec un chromamètre pour les mangues réunionnaises. La teneur en sucre soluble (°Brix) des pulpes est évaluée avec l'aide d'un saccharimètre. 1g de poudre de pulpe sont ajoutés de 10 ou 20mL d'eau distillée, la solution ainsi obtenue est titrée avec de la soude 0.1M pour en connaître le pH ainsi que la quantité d'acide titrable.

2. Détermination du ou des composés actifs du système huile essentielle

a. Principe

Il s'agit de :

- connaître tous les composants de l'HE et la teneur de chaque composant dans chaque HE soit les molécules associées à la fongitoxicité des HE choisies et à l'efficacité du traitement mis au point
- déterminer la fongitoxicité in vitro et in vivo du composant majeur de l'HE de girofles malgaches ainsi que son effet sur la teneur en molécules fongicides de la peau des fruits. La comparaison entre ces données permettra de statuer si la fongitoxicité de l'HE est basée sur un principe actif ou sur l'interaction entre les divers composants de l'HE.

b. Approche méthodologique

i. Détermination de la composition chimique des huiles essentielles

- Procédure d'extraction

Toutes les HE ont été extraites par hydrodistillation sur des alambics fonctionnant comme des appareils de type Clevenger. Lorsque le ballon qui contient la solution aqueuse est mis à chauffer, l'eau se vaporise. Cette vapeur casse les cellules végétales, libérant les molécules d'intérêt. Les plus volatiles d'entre elles sont emportées avec la vapeur. Celle-ci est ensuite refroidie dans un condenseur. Et les différentes substances sont récupérées séparément dans de la verrerie de laboratoire.

Les analyses de la composition de chaque HE utilisée dans cette étude ont été réalisées au sein du pôle « protection des plantes » du CIRAD REUNION situé dans la station Ligne Paradis.

- Couplage Chromatographie en phase gazeuse et Spectrométrie de Masse (CPG/SM)

Les analyses CPG/SM ont été réalisées dans un chromatographe de type CLARUS 480+, équipé d'une colonne capillaire Elite-5MS de 60 m de longueur et de 0,25 mm de diamètre intérieur, avec une phase stationnaire greffée de type DB-1 [1,4-bis (dimethylsiloxy)phenylene dimethyl polysiloxane]. L'épaisseur du film est de 0,25 µm. Le

détecteur de masse est de type quadripôle, l'énergie d'ionisation utilisée est égale à 70 eV. Conditions de manipulation : programmation de température : 40-250°C à 60°C/min ; température d'injection : 250°C ; débit du gaz vecteur (hélium) : 0,6 ml/min ; volume de l'injection : 1 µl d'une solution d'EO diluée à 10% dans de l'hexane.

- Identification des constituants

L'identification des constituants a été réalisée sur la base de leurs indices de rétention calculés par comparaison des temps de rétention (TR) avec ceux d'une série d'alcane (C9-C20) et par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des bibliothèques NBS75K/NIST + MASS FINDER et de la bibliothèque du laboratoire (constituée à partir d'isolats de matières premières) et de la littérature (Adams, 2017).

- Quantification des constituants

La teneur de chaque composant est évaluée à partir de l'aire de chaque spectre sur le chromatogramme. Plus précisément, elle est évaluée en pourcentage de la somme de toutes les aires sur le profil.

$$TC = \frac{\text{Aire COMPOSANT} \times 100}{\sum \text{de TOUS les Aires}}$$

ii. Détermination du ou des composés actifs de l'huile essentielle la plus fongicide

Les effets du composant majeur de l'HE la plus fongicide (HE de girofles malgaches) sur la croissance mycélienne, sur la germination conidiale, sur la sévérité de l'anthracnose au niveau des mangues réunionnaises, sur l'incidence de maladies post-récoltes au niveau des fruits malgaches, sur les propriétés chimiques des pulpes, ainsi que la teneur en molécules fongicides de la peau du fruit ont été évalués sur le même dispositif que les HE (cf. Partie II-II) puis comparés à ceux de l'HE dont il a été extrait. Ce composant a été fourni par une organisation privée qui l'extrait et en fait le commerce (Centre de technique horticole de Tamatave).

3. Analyse des données

Un pourcentage d'inhibition (I) est calculé à partir de chaque paramètre mesuré, à savoir la germination conidienne (nombre de spores germées), la croissance mycélienne (le diamètre de la culture), la sévérité de la maladie (la surface moyenne des lésions) et l'incidence de maladies (nombre de lésions) observées avec l'eugénol d'après la formule :

$I(\%) = (\text{Data T} - \text{Data Z}) * 100 / \text{Data T}$
Data T: données dans les témoins non traités Data Z : données dans les traitements

Ce pourcentage subit par la suite une transformation angulaire et avec les autres paramètres mesurés (couleur de la pulpe, taux de sucres solubles, acidité titrable, pH, activité PAL, teneur en résorcinol), ils subissent une analyse de distribution et une analyse statistique descriptive. Si la distribution est normale et l'écart-type homogène, une analyse de variance est effectuée. Si cette analyse s'avère positive, une recherche des groupes homogènes est par la suite effectuée avec le test de Tuckey. Les moyennes seront alors suivies de lettres indiquant le groupe auquel ils sont affiliés. Ainsi, celles suivies des mêmes lettres sont homogènes. Si la distribution n'est pas normale et la variance homogène entre les différents groupes, le pourcentage d'inhibition est soumis au test de Krustal-Wallis ou de Wilcoxon.

Les analyses ont été effectuées avec le logiciel R, selon le protocole décrit par Seefeld et *al.* (2007).