

Environ 25-50% de la production fruitière mondiale est perdue à cause de dégâts et maladies après-récoltes (FAO, 2013), ces maladies survenant elles-mêmes suite à des blessures et des contaminations par des champignons phytopathogènes (Sholberg and Conway, 2004; Strange and Scott, 2005). Auparavant, les composés toxiques utilisés contre le développement de ces champignons étaient surtout de nature synthétique et chimique tels captan, thiram, cyprodinil, chlorothalonil, azoxystrobin, et kelthane (Smith et *al.*, 2016). Mais ces produits sont souvent associés à des retombées néfastes au niveau écologique, mais aussi sanitaire dues aux résidus laissés sur les fruits (Ardjouma et *al.*, 2005; Chauzat and Faucon, 2007; Sharma and Pongener, 2010). L'apparition d'un nouveau concept prônant l'utilisation de produit biologique, rendant des services environnementaux et à coût modéré, à la place de produits chimiques pouvant être néfastes pour l'environnement et à la santé, a conduit de nombreuses entreprises à investir dans un label écologique par l'exploitation des huiles essentielles (HE) comme répulsifs d'insectes nuisibles et préservateurs alimentaires (Janisiewicz and Korsten, 2002; Sivakumar and Bautista-banos, 2014).

Dans le domaine de la protection post-récolte des fruits, de plus en plus de recherches ont vu le jour sur la capacité des HE à inhiber le développement de champignons phytopathogènes à l'origine de ces maladies (Shaaban et *al.*, 2012). Ces pathogènes sont présents sur l'arbre fruitier atteint de maladie, les spores se propagent sur les fruits et se fixent sur ces derniers avant la récolte et germent lorsque les changements métaboliques emmenés par la maturation des fruits le permettent (Webster and Weber, 2007). Dans le cas de l'anthracnose de la mangue, causée par le genre *Colletotrichum asianum* ou *C. gloeosporioides*, dans les bonnes conditions de température, d'humidité et de lumière, ces spores sont des conidies et germent en appressorium, une structure infectieuse capable de pénétrer la défense du fruit (Ibarra-garza et *al.*, 2015; Verhoeff, 1974). Ces appressoria pénétreront la peau du fruit à travers les stomates, développeront un dispositif de nutrition appelée haustorium à l'intérieur des cellules du fruit. Ce haustorium affectera le métabolisme primaire et secondaire de la cellule hôte, évoluera en un mycélium qui produira des conidies qui seront libérées par éclatement de la cellule hôte et qui infecteront d'autres cellules du fruit par le même procédé. Il en résulte une désorganisation interne et progressive des cellules du fruit à partir du site d'infection, qui accélérera sa sénescence et se manifeste à l'extérieur par des taches accompagnées ou non de suintance et de hyphes mycéliens, parfois même des conidies (Ploetz et *al.*, 2015). Le genre *Fusarium* engendre directement une infection sans passer par le stade appressorial et le développement d'haustorium, en s'insinuant entre les cellules et en se pénétrant directement le contenu cellulaire.

Ainsi la plupart des recherches se sont concentrées sur le blocage de la germination des spores, la croissance mycélienne et le développement des appressoria en hyphe mycélien (Sharma and Pongener, 2010) par diverses manières, dont :

- certains micro-organismes antagonistes pouvant inhiber les pathogènes des fruits (Sharma et *al.*, 2009). L'utilisation des bactéries comme *Pseudomonas* et des levures comme *Sporobolomyces* a donné de bons résultats contre *Penicillium* sur les pommes (Borcard, 1998). Des améliorations ont été apportées en incorporant ces organismes antimicrobiens et antifongiques ainsi que d'autres produits fongicides dans des coatings favorisant le maintien de la qualité du fruit. Le coating le plus connu et le plus efficace est le chitosan (il y en a d'autre, tout aussi naturel comme le gel d'*Aloes vera*, la cellulose, la pectine) un polysaccharide dérivé (acétylé) de la chitine extraite de la carapace des crustacés. Il peut aussi diminuer le pouvoir infectieux de l'inoculum et dans cet axe, homogénéise aussi la dispersion des gouttelettes d'HE sur le fruit (Bill et *al.*, 2014; Dhall, 2016; Sivakumar and Bautista-banos, 2014). Il est utilisable à la fois au stade pré et post-récolte (Herna and Herna, 2006). L'incorporation de *Bacillus subtilis* et *Trichoderma spp.* dans ces coatings ont donné de bons résultats sur les mangues éthiopiennes (Admasu et *al.*, 2014). En effet, le genre *Trichoderma* semble être un antagoniste fort de *C. gleosporioides* à l'origine de l'antracnose des mangues (Prabakar et *al.*, 2008).

- l'application pré-récolte du calcium chloride contre la germination des spores de *Colletotrichum gloeosporioides* (Madani et *al.*, 2014)

- les molécules antioxydantes qui diminuent la germination des spores et la croissance mycélienne de *C. musae* (Khan et *al.*, 2001)

- la modification de l'atmosphère de conservation des fruits. En effet, un taux élevé d'oxygène et faible en dioxyde de carbone par rapport à l'air environnante ralentit la senescence du fruit tout en bloquant les pathogènes (Kader and Ben-yehoshua, 2000).

D'autres traitements comme la chaleur et le rayonnement ultraviolet agissent sur le fruit. Le traitement à la chaleur retarde la senescence du fruit et maintient la capacité de ce dernier à se défendre des pathogènes et ce en agissant sur la régulation de l'éthylène (Lurie, 1998). Ce traitement ralentit l'apparition de maladies post-récoltes causés par certains champignons. Les rayonnements UV diminuent l'incidence de maladies post-récoltes sur les fruits en stimulant les mécanismes de défense interne des fruits (González-Aguilar et *al.* , 2007). L'oxyde nitrique stimule les défenses interne des fruits tout en retardant la senescence de ces derniers (Hua et *al.*, 2014).

Cette étude se propose d'évaluer le potentiel de la biodiversité malgache dans la production d'antifongique contre les champignons phytopathogènes des fruits. Il s'agit de déterminer les modalités dans lesquelles les HE choisies:

- affectent deux pathogènes post-récoltes : le genre *Fusarium* et le genre *Colletotrichum*. Trois paramètres sont pris en compte : l'HE, la concentration et l'organisme cible

- inhibent le développement de maladies post-récoltes sur les fruits en conservation. Plusieurs paramètres sont pris en compte : l'HE, la concentration de cette dernière, le fruit et le pathogène.

Plusieurs HE reconnues pour leurs propriétés antifongiques ont été ciblées par cette étude. Il s'agit de l'HE de :

- girofles malgaches (*Syzygium aromaticum* L.). Madagascar est un grand producteur de girofle. C'est donc une espèce qui est largement adaptée aux conditions pédologiques et climatiques de l'île et dont la culture est maîtrisée (Francois, 1928; Razafimamonjison et *al.*, 2014). L'étude de sa fongitoxité permettrait de voir le potentiel des espèces déjà domestiquées sur l'île à produire des traitements antifongiques post-récoltes contre les champignons phytopathogènes des fruits.

- ravensare (*Ravensara aromatica* Sonnerat). C'est une espèce endémique répandue sur la côte Est de Madagascar. L'étude de la variation de l'HE de cette espèce sur toute la population de l'île a révélé une grande variabilité chimique en fonction de l'écosystème dont elle provient (Andrianoelisoa et *al.*, 2006). L'étude de ses propriétés antifongiques illustrerait l'influence du terroir sur la fongitoxité des HE issues de la biodiversité du pays.

- huiles industrielles dont cinq formulations industrielles, déjà commercialisées sur le marché. Leur utilisation servira de référence pour situer le potentiel des HE malgaches par rapport à des noms d'HE connues pour leur efficacité contre les pathogènes post-récoltes des fruits mais aussi leurs propriétés antigerminatives.

I. Approche méthodologique

La mise au point d'un traitement alternatif commence par la mise en évidence d'une activité toxique d'un produit vis-à-vis d'un organisme cible. Un cadre in vitro est approprié à la poursuite d'un tel objectif dans la mesure où il procure un maximum de contrôle sur les conditions environnementales, qu'elles soient abiotiques telles la température, l'humidité, ou biotiques telles que la compétition pour le nutriment ou pour le produit lui-même. Cette toxicité in vitro est par la suite transférée in vivo, afin de trouver les modalités réelles dans lequel le produit conserverait sa toxicité et par conséquent son efficacité contre le pathogène et la pathologie sur des fruits en conservation.

Ainsi cette deuxième partie a pour objectifs de caractériser les effets de dix HE sur la germination conidiale, la germination appressoriale et la croissance mycélienne du genre *Colletotrichum* et *Fusarium* ainsi que leur capacité à réduire le développement de maladies post-récoltes sur des bananes, mangues et papayes malgaches ainsi que le développement de l'anthracnose sur les mangues réunionnaises.

1. Modèle

Dans ce cas, le modèle d'étude est constitué de :

- 10 HE : dont

- 5 HE malgaches :

- 4 types chimiques d'une HE à forte variabilité : *Ravensara aromatica* (ravensare). Elles ont été commandées auprès d'ONG locaux dans les diverses zones d'habitation de l'espèce. *Ravensara aromatica* est reparti dans diverses régions de la grande île (Annexe 2). Il s'agit du type methyl chavicol (Type MC), du type methyl eugénol (Type ME), type limonène (Type L) et type sabinène (Type S).

- Une HE à faible variabilité : *Eugenia caryophyllata* (girofle). L'HE de girofle a été fournie par le Centre de Techniques Horticoles de Tamatave. Elle a été extraite à partir de feuilles fraîches collectées dans la région Antsinanana de la Grande Ile (18° 40' 01" Sud, 48° 54' 40" Est). La répartition de cette espèce sur la Grande Ile est présentée en annexe (Annexe 3).

- 5 HE industrielles (ajoutées à titre comparatif) :

- L'HE de girofle (*Syzigium aromaticum*)
 - L'HE de menthe (*Mentha spicata*)
 - L'HE de girofle + HE de menthe
 - L'HE de thym (*Thymus vulgaris*)
 - L'HE de géranium (*Pelargonium graveolens*)

- 8 volumes d'HE ajoutées à chaque culture : 10, 20, 50, 100, 200, 250, 500, 1000µL.
- 2 volumes d'HE incubées avec les fruits : 250, 500µL.
- 2 zones géographiques : Ile de la Réunion, Madagascar
- 5 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
 - *Colletotrichum gloeosporioides* isolée à partir de mangues réunionnaises
 - *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)

2. Dispositif expérimental

a. Caractérisation de la fongitoxicité in vitro des huiles essentielles

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 Réunion - Station Ligne Paradis.

i. Détermination de la toxicité vis-à-vis de la germination des spores

Des milieux stériles Potato dextrose agar (Annexe 6) ont été préparés au préalable. Une solution de spores contenant 1000 spores /mL est constituée par dilution à partir d'une culture agée de 10 jours. 33µL de cette solution est prélevé, puis étalé sur le milieu avant d'être déposé sur le couvercle de la boîte surlequel la quantité voulue d'HE a été préalablement déposée. L'ensemble est par la suite scellé avec un parafilm. La culture est alors incubée à 27°C (Planche 4a). Le nombre de spores germées est compté journalièrement. Au bout d'une semaine, l'HE est retirée, ainsi que le parafilm. L'expérience est arrêté au bout de 15 jours.

ii. Détermination de la toxicité vis-à-vis de la germination appressoriale

Une solution de spores contenant 1000 spores /mL est préparée au préalable à partir d'une culture agée de 10 jours. 50µL de cette solution sont prélevées et déposées sur un fruit nettoyé, stérilisé et par la suite recouvert d'un disque de papier filtre surmonté d'un coton imbibé d'eau distillée. Le développement d'appressoria sur la zone ainsi inoculée sur le fruit est observé à l'aide d'un microscope binoculaire après deux jours d'incubation. Un carré de 25mm² de cette zone inoculée est ensuite prélevé et étalé sur le milieu. La dose d'HE voulue est déposée par la suite sur le couvercle de la boîte qui sera refermée et scellée (Planche 4b) puis incubée à 27°C. La présence ou absence de mycélium est notée chaque jour. Au bout d'une semaine, l'HE est retirée, ainsi que le parafilm. L'expérience est arrêtée au bout de 15 jours.

iii. Détermination de la toxicité vis-à-vis de la croissance mycélienne

A partir d'une culture agée de 10 jours, un disque de mycélium de 25mm² a été prélevé et déposé sur des milieux stériles de potato dextrose agar préalablement préparés. Le volume voulu d'HE est par la suite déposé sur le couvercle des boîtes. Après fermeture de chaque boîte (Planche 4c), les cultures sont incubées à 27°C. Le diamètre de chaque culture est alors noté journalièrement. Au bout d'une semaine, l'HE est retirée, ainsi que le parafilm. L'expérience est arrêtée au bout de 15 jours. Les disques qui n'ont montrés aucune croissance sont alors recultivés sur milieux frais.

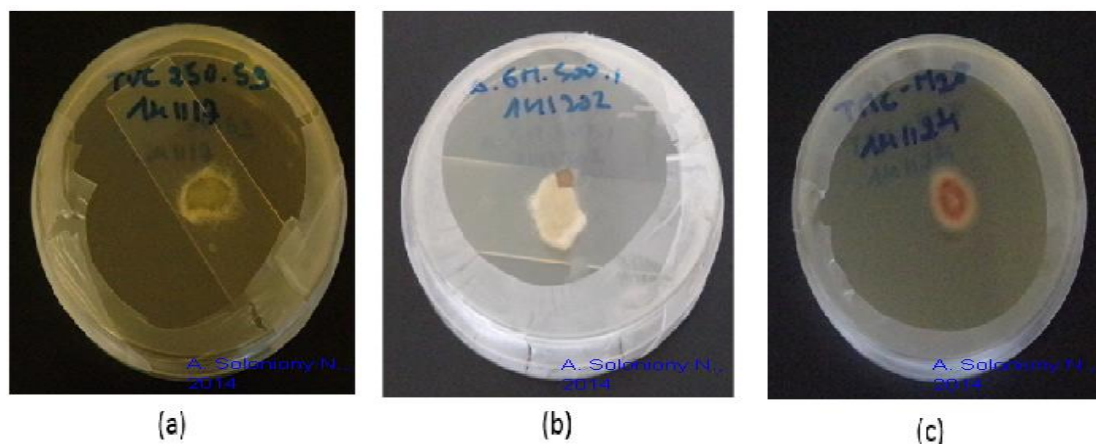


Planche 4: Dispositif n°1 caractérisant la fongitoxicité in vitro des huiles essentielles (a): vis-à-vis de la germination conidienne; (b) vis-à-vis de la germination appressoriale et (c) vis-à-vis de la croissance mycélienne des pathogènes choisis

b. Caractérisation de la fongitoxicité in vivo des huiles essentielles

i. Détermination de la capacité inhibitrice des maladies post-récoltes des huiles essentielles

-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 et pesés. Dans le cas des bananes dont le murissement est très variable d'un doigt à l'autre sur une même main, un apport exogène d'éthylène par immersion dans l'éthéphon (Ethrel® 480SL) a été utilisé pour provoquer le murissement des fruits et le rendre homogène sans altérer leurs qualités (Pendharkar et *al.*, 2011). En effet, le murissement de fruit est régulé par l'éthylène dont la synthèse est régulée par le développement du fruit depuis l'anthèse (Burg and Burg, 1962; Mohapatra et *al.*, 2010).

-Inoculation

Le protocole d'inoculation choisie est établie à partir du modèle d'innoculation de *C. gloeosporioides* sur le piment (Hong et *al.*, 2015). Deux zones d'inoculation par fruit sont délimitées par un rond avec un marqueur permanent. Une suspension de spores à 10^5 sp/mL est préparée et 30µL puis déposée sur chaque rond. L'humidité nécessaire à la germination des spores ainsi que le développement d'appressoria est assurée par une rondelle de papier filtre surmontée d'un coton imbibé d'eau que l'on place sur la suspension de spores préalablement déposée dans les zones d'innoculation. L'ensemble est fixé sur le fruit par un scotch. Pour la suite des expérimentations, les fruits sont conservés dans une chambre froide maintenue à 20°C.

-Traitement

Après deux jours d'incubation, le dispositif d'humidification est enlevé de la zone d'inoculation. Puis l'intérieur de deux caissons de 10L est recouvert avec du papier aluminium afin de limiter l'imprégnation d'HE. 10 fruits sont ensuite déposés dans deux caissons et l'intérieur de l'un des caissons est pulvérisé avec 500mL d'HE. Tout est refermé puis incubé dans la même chambre froide 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'apparition et l'évolution de lésions sont observées journalièrement. L'expérience est arrêtée quand les mangues pourrissent (environ deux semaines après l'inoculation des

souches). La longueur et la largeur des lésions dans la zone d'inoculation sont mesurées afin de calculer la sévérité de la maladie (SM, en mm²) par la formule :

$SM = (\text{Surface de la lésion 1} + \text{Surface de la lésion 2})/2$
--

Le nombre de lésions hors de la zone d'inoculation est compté en fin d'expérience et constitue l'incidence de la maladie. L'expérience est arrêtée quand les fruits pourrissent (environ une semaine après l'incubation)

c. Traitement et 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 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 avant d'être soumis à un test de distribution et une analyse statistique descriptive. Si la distribution des données 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 des données 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. Si la distribution des données n'est pas normale et la variance hétérogène, le pourcentage d'inhibition est soumis au test de Welch.

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

II. Résultats

Pour évaluer leurs potentialités fongitoxiques, cinq HE malgaches et cinq HE industrielles ont été mises à incuber dans des cultures de spores, d'appressoria et de mycélium de trois souches de *Fusarium* issues des fruits malgaches ainsi que deux souches de *Colletotrichum* issues de fruits étrangers. Les effets de ces HE sur la germination de ces spores et appressoria, ainsi que ces mycéliums sont décrits dans cette partie, parallèlement à l'aptitude de ces HE à prévenir l'apparition de maladies sur des fruits en conservation.

1. La fongitoxicité in vitro des huiles essentielles

a. Screening préliminaire (Planche 5)

i. Le volume d'huile essentielle

La dépendance de ses activités biologiques de la dose utilisée ayant déjà fait l'objet d'études, l'HE de *R. aromatica* de type MC a été utilisée pour rechercher la dose efficace pour inhiber la germination conidienne et la croissance mycélienne et ainsi mettre en évidence l'influence de la concentration en HE sur la résistance des champignons phytopathogènes post-récoltes, ici, *C. gloeosporioides* isolées sur des mangues réunionnaises (Figure 8).

La régression linéaire du modèle « Volume d'HE et inhibition de la germination conidienne » a montré une augmentation de l'inhibition avec le volume d'HE utilisé ($R^2 = 0.145$, $p\text{-value} < 2.2e-16$).

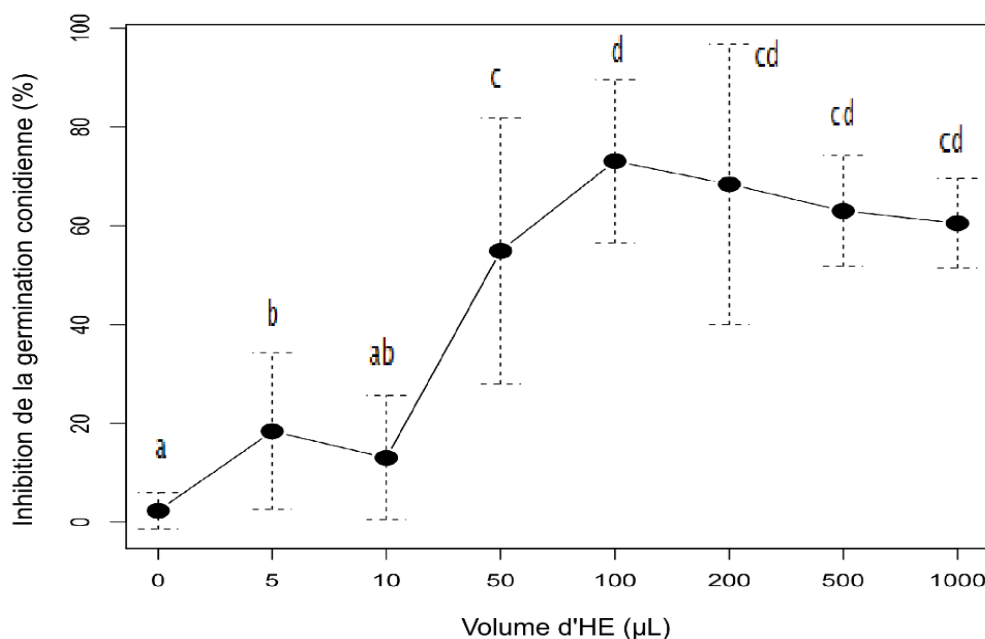


Figure 8: Effet de l'application en aérosol de sept volumes d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* type MC sur le taux d'inhibition de la germination conidienne de *Colletotrichum gloeosporioides* (au risque $\alpha=0.05$, les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes)

Il en est de même avec la croissance mycélienne (Figure 9). Le test de Tuckey a révélé une différence significative entre les inhibitions de la croissance mycélienne des divers volumes d'HE utilisées ($\alpha = 0.05$, $p\text{-value} < 2e-16$), et la régression linéaire du modèle révèle aussi une augmentation de cette inhibition avec le volume d'HE ($R^2 = 0.689$, $p\text{-value} = 9.896e-06$).

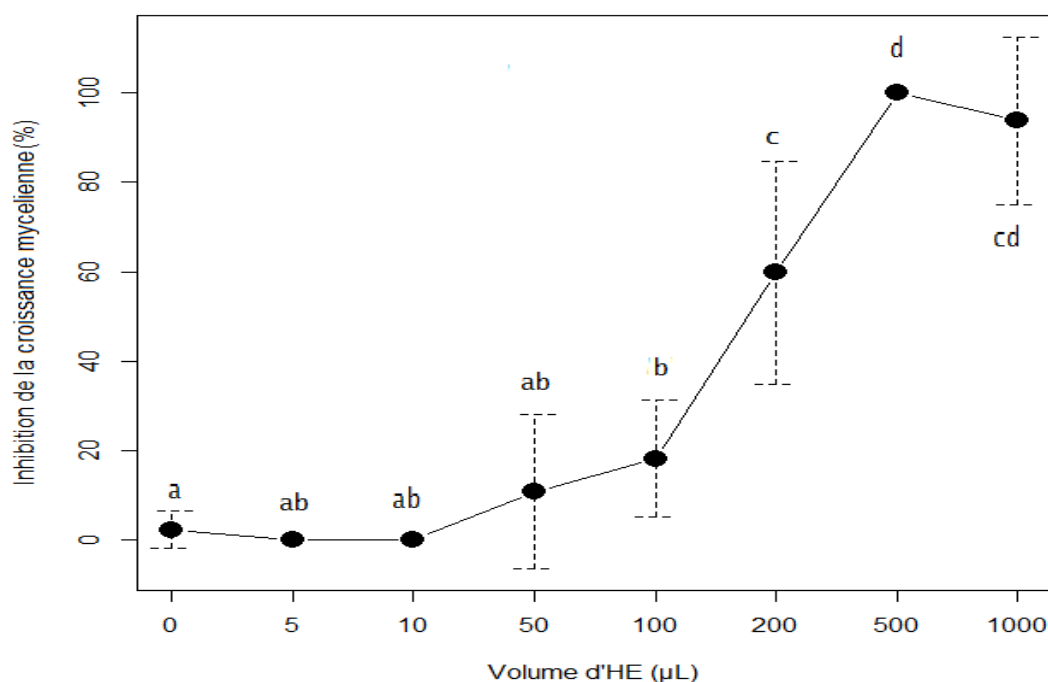


Figure 9: Effet de l'application en aérosol de sept volumes d'huile essentielle de *Ravensara aromatica* type MC sur le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Colletotrichum gloeosporioides* ((au risque $\alpha=0.05$, les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes)

ii. Le type d'huile essentielle

Le choix de l'HE est aussi une étape décisive dans la mise au point d'un traitement à base d'HE efficace. L'expérience sur la dose-dépendance de l'activité antifongique de l'HE de ravsare type MC a révélée que cette activité commence à un seuil de 10µL mais un maximum d'activité n'est atteint que vers les 500µL d'HE utilisée. C'est donc ce dosage qui a servi à la mise en évidence d'une activité fongique chez nos dix produits puis à la comparaison de ces dernières, le cas échéant.

Dans un premier temps, la sensibilité de la germination in vitro de *C. gloeosporioides* à dix HE a été étudiée et présentée dans la figure 10. L'analyse de la variance (ANOVA) a montré que la germination conidienne est inhibée dans tous les traitements, que cette

inhibition varie significativement d'un traitement à l'autre ($\alpha = 0.05$, p-value $<2e-16$). L'analyse des effets des divers paramètres de l'expérience a révélé que cette germination conidienne varie aussi en fonction de l'HE ($\alpha = 0.05$, p-value $<2.2e-16$), du volume de cette dernière ($\alpha = 0.05$, p-value $<2.2e-16$), et que la variation observée est tributaire de l'interaction entre ces deux facteurs ($\alpha = 0.05$, p-value $<2.2e-16$).

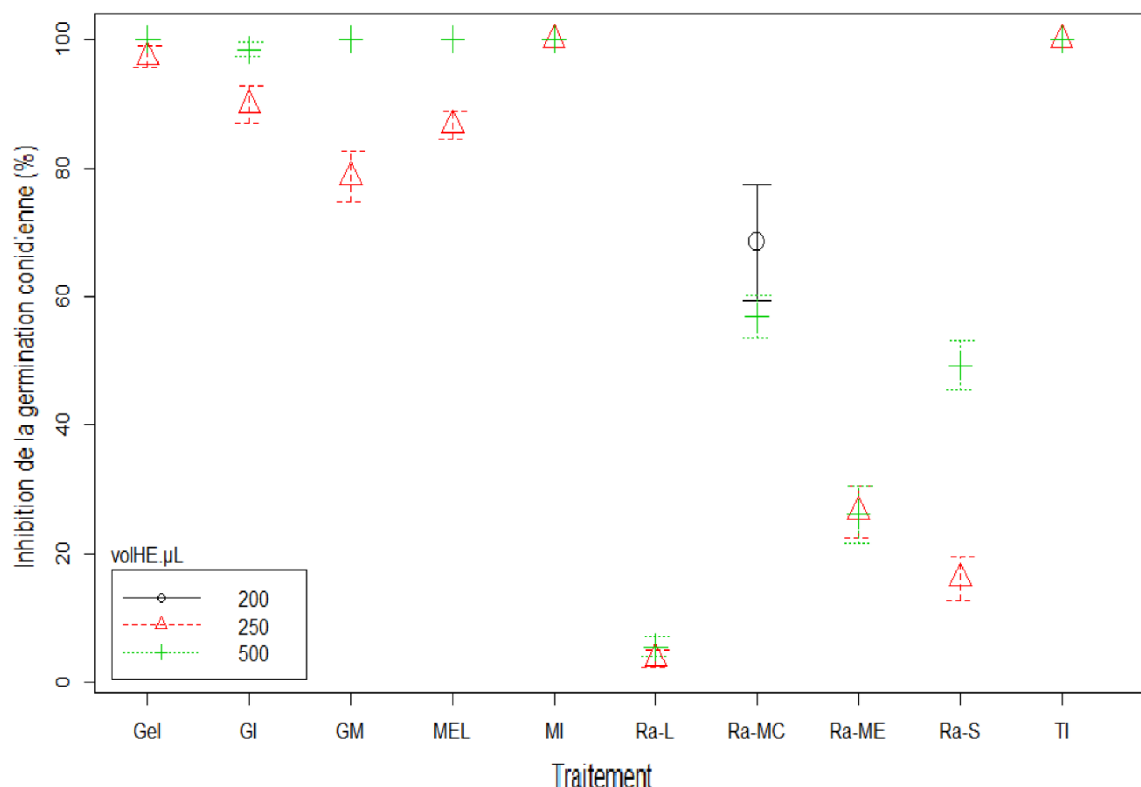


Figure 10: Effet de l'application en aérosol de dix huiles essentielles sur le taux d'inhibition de la germination conidienne de *Colletotrichum gloeosporioides* ($\alpha = 0.05$, p-value $<2e-16$).

GeI : huile essentielle de géranium industrielle, GI : huile essentielle de girofle industrielle, GM : huile essentielle de girofles malgaches, MEL : mélange industrielle huile essentielle de menthe + huile essentielle de girofle, MI : huile essentielle de menthe industrielle, Ra-L : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type limonène, Ra-S : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type sabinène, Ra-ME : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type méthyl eugénol, Ra-MC : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type méthyl chavicol. Volume d'huile essentielle utilisé : 250 et 500 µL.

Le test de Tuckey sur cette germination conidienne de *C. gloeosporioides* regroupe les inhibitions obtenues avec les HE industrielles et l'HE de girofle malgache dans un même groupe, avec une inhibition de 100% avec 500µL d'HE. Pour les HE de ravensare, les inhibitions de la germination conidiennes obtenue avec l'HE de type méthyl chavicol et de type sabinène sont les plus élevées (40-80%), les autres types induisent des inhibitions faibles mais statistiquement similaires.

La croissance mycélienne de *C. gloeosporioides* est aussi inhibée par les traitements à huiles essentielles utilisées (Figure 11). L'inhibition observée varie aussi significativement d'un traitement à l'autre ($\alpha = 0.05$, p-value $<2e-16$). L'Anova a révélé que l'huile essentielle utilisée ($\alpha = 0.05$, p-value $<2.2e-16$), le volume de cette dernière ($\alpha = 0.05$, p-value $<2.2e-16$) ont des effets significatifs sur cette inhibition. L'analyse de variance a aussi révélé que cette variation de l'effet inhibiteur d'un traitement à l'autre est la résultante de l'interaction entre ces deux facteurs ($\alpha = 0.05$, p-value = $1.395e-09$).

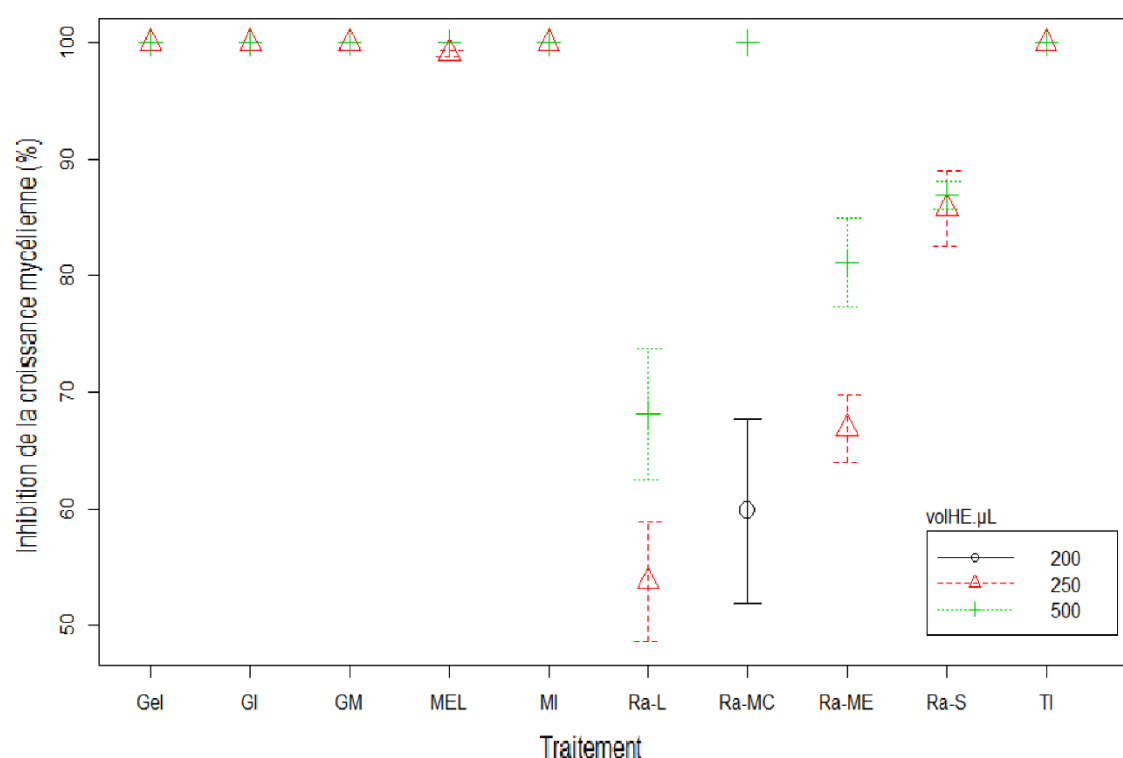


Figure 11: Effet de l'application en aérosol de dix huiles essentielles sur le taux d'inhibition de la croissance mycélienne de *Colletotrichum gloeosporioides* ($\alpha = 0.05$, p-value = $<2e-16$).

Gel : huile essentielle de géranium industrielle, GI : huile essentielle de girofle industrielle, GM : huile essentielle de girofles malgaches, MEL : mélange industrielle huile essentielle de menthe + huile essentielle de girofle, MI : huile essentielle de menthe industrielle, Ra-L : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type limonène, Ra-S : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type sabinène, Ra-ME : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type méthyl eugénol, Ra-MC : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type méthyl chavicol. Volume d'huile essentielle utilisé : 250 et 500 µL.

Ainsi, d'après le test de Tuckey, les traitements à HE industrielles sont les plus inhibiteurs. Les inhibitions de la croissance mycélienne qu'elles engendrent sont totales (100%), identiques entre elles et sont similaires à celles engendrées par l'HE de girofles malgaches. Les traitements à HE de ravensare, par contre, induisent une inhibition moindre par rapport aux traitements cités précédemment et variable d'un type chimique à l'autre.

Les effets des traitements à huile essentielles sur la germination appressoriale se manifestent par une inhibition, soit une diminution par rapport aux témoins non traités avec les huiles essentielles. D'après la figure 12 qui illustre ce résultat et le test de Tuckey qui a été effectué, cette inhibition de la germination appressoriale diffère d'un traitement à l'autre de façon significative ($\alpha = 0.05$, $p\text{-value} < 2e-16$).

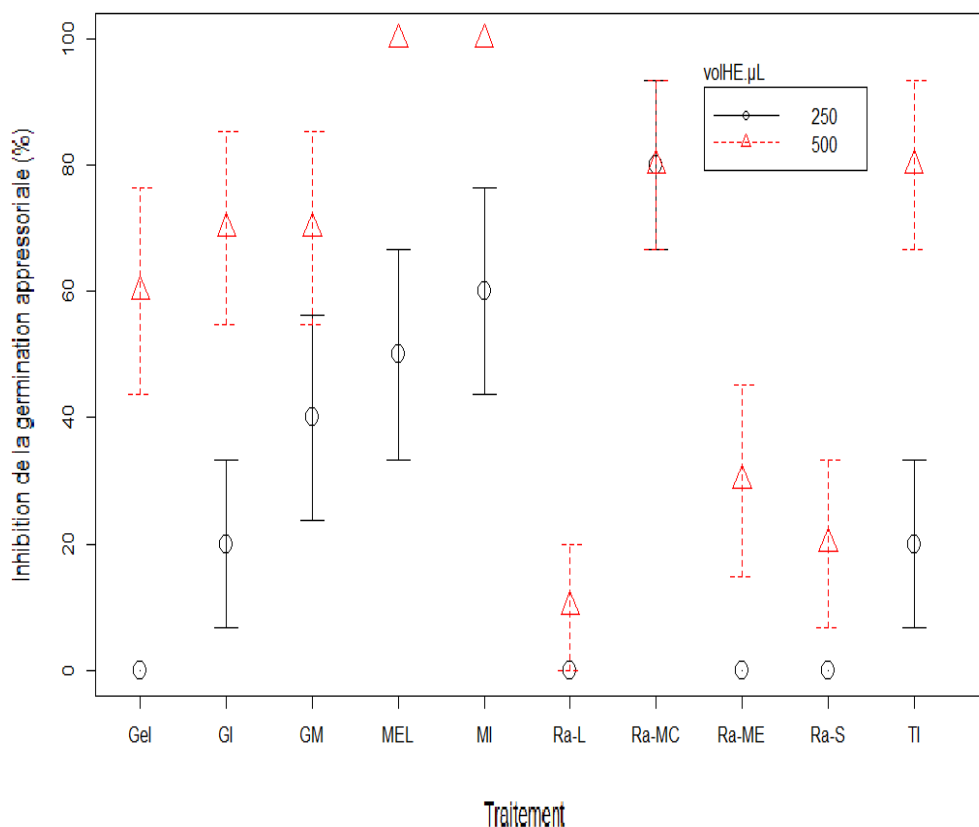


Figure 12: Effet de l'application en aérosol de dix huiles essentielles sur le taux d'inhibition de la germination appressoriale de *Colletotrichum gloeosporioides* ($\alpha = 0.05$, $p\text{-value} = < 2e-16$).

GeI : huile essentielle de géranium industrielle, GI : huile essentielle de girofle industrielle, GM : huile essentielle de girofles malgaches, MEL : mélange industrielle huile essentielle de menthe + huile essentielle de girofle, MI : huile essentielle de menthe industrielle, Ra-L : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type limonène, Ra-S : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type sabinène, Ra-ME : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type méthyl eugénol, Ra-MC : huile essentielle de *Ravensara aromatica* de type méthyl chavicol. Volume d'huile essentielle utilisé : 250 et 500 µL.

D'autres analyses de variance révèlent que le type d'HE ($\alpha = 0.05$, $p\text{-value} = 4.195e-15$) et le volume d'HE ($\alpha = 0.05$, $p\text{-value} = 4.195e-15$) contribue à cette inhibition. Toutefois, ces analyses n'ont mis en évidence aucune interaction entre ces deux facteurs ($\alpha = 0.05$, $p\text{-value} = 0.1155$). Une analyse de la corrélation entre le volume d'HE et cette inhibition de la germination appressoriale confirme une évolution positive de cette dernière

avec l'augmentation du volume d'HE utilisé lors du traitement ($r = 0.4269745$, $p\text{-value} = 1.321e-10$).

Le taux d'inhibition de la germination appressoriale de *C. gloeosporioides* est fonction du volume d'huile essentielle utilisé pour certaines huiles essentielles, et ne l'est pas pour d'autres (girofle malgaches et *R. aromatica* type méthyl chavicol). Particulièrement, les traitements contenant 500 μ L de deux HE industrielles (menthe et mélange menthe + girofle) inhibent totalement le développement des appressoria en mycélium. Pour les autres traitements à huiles industrielles, les effets inhibiteurs observés fluctuent entre 0-80% d'inhibition de la germination appressoriale.

Les traitements à huiles essentielles de *R. aromatica* ont une capacité inhibitrice de la germination appressoriale assez faible (0-40%), sauf le type MC (60-90%).

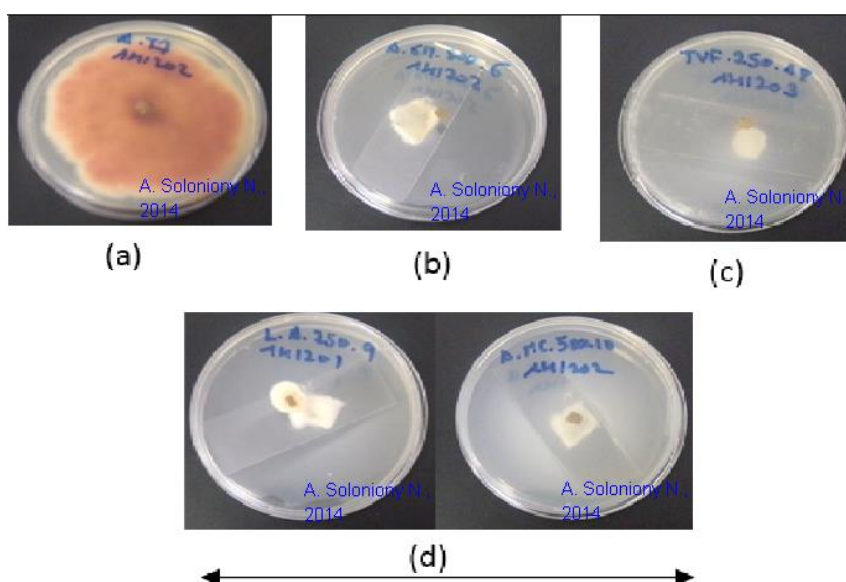


Planche 5: Germination appressoriale de *Colletotrichum gloeosporioides* (a): sans Huile essentielle; (b) avec l'huile essentielle de girofle ; (c) avec l'huile essentielle de menthe industrielle, (d) avec les huiles essentielles de ravensare.

b. Amélioration du dispositif

Un traitement optimal étant celui nécessitant une quantité minimale d'HE, le traitement a été mis au point autour de la dose minimale inhibitrice, à savoir 10 μ L (112.5 μ L/L d'air), la toxicité d'une gamme réduite d'HE a été réévaluée sur une dose de 10 et 20 μ L (112.5 μ L/L et 225 μ L/L d'air). Tenant compte de la sensibilité des appressoria à la toxicité des HE, et de la nécessité pour un bon traitement alternatif post-récolte des fruits tropicaux contre les champignons phytopathogènes d'être au minimum toxique pour la germination appressoriale, l'HE de menthe serait sans doute la candidate la plus prometteuse. Mais cette

huile étant une HE expérimentale produite par une société privée (Xeda Intenationale), que Madagascar n'est pas un grand producteur d'HE de menthe, que la différence entre sa toxicité et celle des HE de girofles malgaches (artisanales) est uniquement de 20%, le reste des études a été fait avec l'HE de menthe industrielle, l'HE de girofle malgache et les HE de ravensare.

L'observation microscopique des cultures traitées avec l'HE de girofle malgache ayant montré une inhibition partielle de la germination conidienne a révélé une augmentation de la taille des tubes germinatifs au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la zone de dépôt de l'HE (Planche 6). Cela suggère une répartition non homogène des gouttelettes d'HE dans la boîte de Pétri qui s'explique par une forte densité et donc une faible volatilité de l'HE de cette espèce (Razafimamonjison et *al.*, 2013). Le dispositif a été retravaillé de façon à permettre une homogénéisation de la répartition des gouttelettes d'HE dans la boîte de Pétri. Cette homogénéisation a été effectuée par imbibition de cette dernière sur un papier qui couvre le couvercle de la boîte. Leur toxicité *in vitro* vis-à-vis des pathogènes des fruits malgaches ainsi que celle de *C. asianum* sont décrites dans les paragraphes suivants.

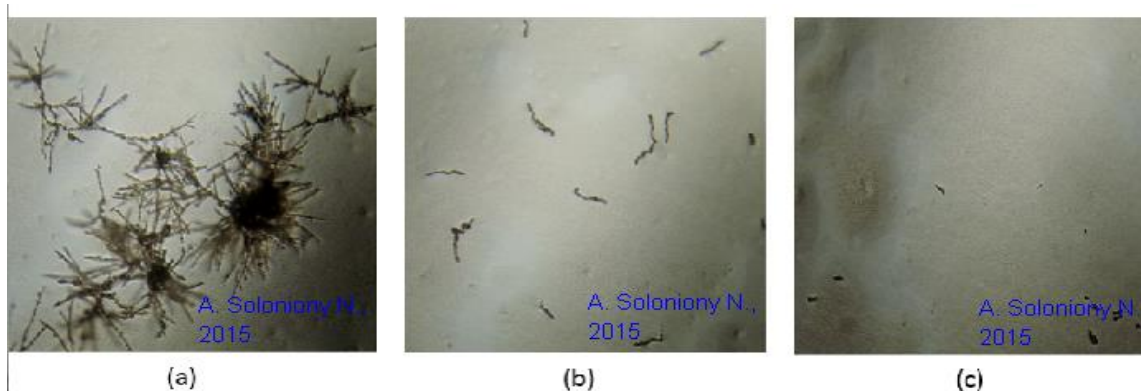


Planche 6: Effet de 20µL d'huile essentielle de girofles malgaches sur les premiers stades de la germination conidienne de *Colletotrichum asianum* (a): A l'extrémité de la boîte; (b) entre le spot d'huile essentielle et l'extrémité de la boîte de Pétri; (c) sous le spot d'huile essentielle (grossissement x40 sous un microscope optique).

Pour tous les pathogènes, la sensibilité aux HE de ravensare est réversible quelque soit le type chimique de cette dernière, tandis que la sensibilité aux HE de girofle malgache et aux HE de menthe industrielle est permanente. Plus précisément, les disques non germés en présence des HE de ravensare ont germé quand ils ont été recultivés sur des milieux frais tandis que ceux incubés avec l'HE de girofles ainsi que les huiles industrielles ont continué de ne pas germer une fois recultivés sur milieu frais.