

**POTENTIALITE FONGITOXIQUE DE QUELQUES HUILES ESSENTIELLES EN
TRAITEMENT POST-RECOLTE CONTRE L'ANTHRACNOSE DE LA
MANGUE.**

ANDRIANJAFINANDRASANA Soloniony Navalonamanitra

(Rapport de stage, Janvier 2015)

Sommaire

Sommaire	2
Introduction	3
Méthodologie	4
Identification des souches par la méthode de la biologie moléculaire	4
Extraction d'ADN	4
Purification d'ADN	4
Polymerase-chain Reaction	5
Séparation par électrophorèse	6
Envoi à séquencer	6
Séquencage	6
Caractérisation de la fongitoxicité des HE vis-à-vis du pathogène	7
Toxicité vis-à-vis de la germination des spores	7
Toxicité vis-à-vis de la croissance mycélienne	7
Toxicité vis à vis du développement mycélien post-appressorial	8
Production d'appressorium	8
Test de toxicité	10
Résultats et interprétation	10
Technique d'identification des souches	10
Toxicité vis-à-vis de la germination des spores	11
Toxicité vis-à-vis de la croissance mycélienne	12
Toxicité vis-à-vis développement appressorial	12
Conclusions et perspectives	13

Introduction

Les pertes post-récoltes touchent 10% de la production agricole en Afrique. L'antracnose post-récolte est une des pathologies responsables de ces pertes pour les fruits tropicaux.

Les moyens de lutte contre cette pathologie sont surtout de nature chimique, on peut citer la prochloraz, l'amphotericine B. Ces produits présentent des inconvénients financiers pour les paysans producteurs de fruits, des inconvénients sanitaires pour les utilisateurs et les consommateurs, ainsi que des inconvénients environnementaux.

Les produits biologiques sont une alternative pour pallier ces défauts du fait de leur plus grande biodégradabilité, leur moindre coût (vu qu'ils sont prélevés au sein même de la biodiversité locale) et leur aspect plus sain pour les consommateurs (grâce à leur nature biologique).

A titre de recherche doctorale, nous nous proposons d'évaluer la pertinence de cette hypothèse pour quelques produits de la biodiversité à des fins de traitement post-récolte contre cette pathologie sur trois fruits malgaches : la mangue, la banane et la papaye.

Dans ce cadre, nous tenons à remercier l'Ambassade de France qui nous a alloués des fonds pour identifier les souches de notre collection et pour concevoir le dispositif expérimental pour caractériser la fongitoxicité de nos huiles essentielles (HE).

Pour des raisons techniques (non obtention des autorisations pour emmener les souches à la Réunion), nous avons dû changer les objectifs de notre stage de trois mois au sein de l'UMR QUALISUD du CIRAD REUNION dont nous remercions tout le personnel de l'accueil chaleureux qui nous ont été prodigué, en particulier le Dr Marc CHILLET, notre encadreur.

Le stage s'est déroulé du 14 Septembre au 12 Décembre 2014. L'objectif du stage était de définir les modalités expérimentales pour la totalité de l'étude sur le modèle de l'antracnose des mangues réunionnaises. L'agent responsable de la pathologie étant déjà isolé, purifié et conservé, deux sous-objectifs restaient à atteindre durant le séjour :

- Se former aux techniques d'identification des souches de notre collection de souches malgaches (méthode de la biologie moléculaire)
- Caractériser la fongitoxicité des HE choisis vis-à-vis de l'antracnose post-récolte de la mangue

Méthodologie

I. Initiation aux techniques d'identification des souches

La formation a été effectuée sur quelques souches de la mycothèque au sein du CIRAD REUNION. Elle contient 44 souches.

Les 44 souches ont été remises en culture sous étuves à 28 °C.

1. Extraction d'ADN

Elle se déroule en étapes :

(i) Préparation d'un tampon de lyse : le tampon B , mixer :

50 mM de Tris-HCl pH8, 25 mM d' EDTA

CTAB 1%

SDS 2%

B- mercaptoethanol 1%

Protéinase K 100µg/ml

(ii) Ajouter 10ml d'EDS sur la culture sporulante de 7 jours, agiter légèrement, racler et recueillir 1,5 ml dans un tube Eppendorf (en prévoir deux par souches)

(iii) Vortexer pendant 5 min (jusqu'à obtention d'un culot) et recueillir le culot)

(iv) Bien savonner le culot avec le mix (avec la micropipette, verser et aspirer plusieurs fois)

(v) Mariner une heure à 60 °C

(vi) Vortexer pendant 5 minutes jusqu'à obtention d'une phase aqueuse bien propre, en recueillir 500µl dans un tube Eppendorf (en prévoir deux par sécurité)

2. Purification

(vii) Ajouter du chloroforme isoamylique volume à volume (ie 500µl), bien vortexer (au moins 5 minutes) et recueillir la phase aqueuse (bien propre quitte à perdre du volume)

(viii) Ajouter 1ml d'éthanol absolue - 4M d'acétate d'ammonium pour précipiter l'ADN, incubé dans la glace 10 minutes, vortexer 5 minutes et jeter l'alcool par renversement

(ix) Ajouter de l'éthanol 70°, vortexer 5 minutes et jeter l'alcool par renversement, sécher à l'étuve à 37 °C afin d'éliminer les sels résiduels

(x) Ajouter 20µl de tampon TE pour solubiliser l'ADN.

3. Polymerase chain réaction (PCR) des régions ITS4 et ITS1

Il s'agit d'isoler et d'amplifier (répliquer n-fois) une zone bien précise de l'ADN. Dans notre cas, la zone entre les amorces (zones spécifiques encadrant un endroit spécifique de l'ADN) ITS1 et ITS qui est caractéristique d'une espèce fongique donnée. Ces deux amorces sont localisées au niveau de la sous-unité 18S et 28S, la région amplifiée regroupe la sous-unité codant pour l'ARN 5.8S et les deux régions ITS.

Le volume final recherché est de 25µl par tubes dont 3µl d'ADN, 2mM de chaque amorce, 0.2mM de dNTP, 1x0.5U de Taq polymerase et de 2.5mM de MgCl₂.

Préparer un mix réactionnel de tous sauf l'ADN. Celui-ci doit être suffisant pour tous les ADN (toutes les souches) et un témoin négatif (eau).

Le régime d'amplification utilisé se tient environ en 2 heures. Il est composé de : 60 secondes d'une pré-dénaturation à 94°C, 30 cycles consécutifs de 60 secondes de dénaturation à 94°C, 60 secondes d'hybridation spécifiques des amorces à 58°C, 60 secondes d'élongation à 72°C et 5 minutes d'une post-élongation à 72°C.

4. Séparation par électrophorèse

Basée sur la capacité des molécules à migrer dans un champ électrique (du pôle positif vers le pôle négatif, l'ADN étant chargé négativement) dans un gel tridimensionnel.

a. Préparation du gel TBE:

Préparer 0.8% d'agarose (Tris Base, Acide Borique, EDTA 0.5M, Agarose), ajouter 40µl de bromure d'éthidium 1%, passer à la micro-onde 3 minutes puis refroidir.

Couler ensuite 50ml de la préparation d'un plateau de moulage équipé d'un peigne pour marquer les puits de dépôts. Laisser refroidir et retirer les peignes.

Le gel est ensuite placé dans la cuve à électrophorèse, les puits étant vers la cathode.

Remplir de tampon TBE jusqu'à recouvrir les gènes.

5µl d'ADN mélangé à 2µl de tampon de migration sont déposés dans chaque puits. Dans le dernier puits, ajouter 3µl de 1KB de Ladder à 100ng/µl, le marqueur de taille moléculaire.

b. Migration et révélation

Effectuer la migration à 80 Volts pendant 5 minutes.

Exposer le gel ensuite sous UV à l'aide d'un GelDoc (biorad) , le BET colore l'ADN qui peut être ainsi visualisé. Grace à Image lab<tm, le gel est ensuite pris en photo.

5. Purification et envoi à séquencer

(pas effectuées mais le protocole prévu est présenté ci-dessous)

a. Purification ADN obtenu après PCR

Un kit de purification GenElute™ PCR est utilisé. Ce kit présente une notice décrivant clairement les étapes à suivre. 20 µL l'ADN sont mélangés à 100 µL d'une solution de fixation. Le mélange est injecté sur une membrane de silice à l'intérieur de la colonne de centrifugation. L'ADN lié est lavé et l'ADN propre, concentré est élué dans le tampon.

b. Préparation à l'envoi (Il s'agit de l'ajustement de la concentration)

Selon la taille des fragments, la concentration d'ADN à envoyer à séquencer varie. La concentration en ADN du produit PCR est déterminée par comparaison de l'intensité de la fluorescence de la bande d'ADN aux bandes de concentration déjà connues. Un dépôt de 3µl du Kb Ladder 100-ng/-µl correspond à 300-ng d'ADN.

6. Séquençage

Les concentrations ajustées, les tubes sont identifiés puis envoyées ainsi que l'amorce ITS4 par voie postale à l'entreprise Eurofins Genomics en Allemagne (prestataire). Eurofins Genomics est un fournisseur international de services génomiques spécialisé dans le séquençage. Les résultats du séquençage sont ensuite disponible sur le site Eurofins.

7. Analyse des séquences'

Les résultats sont reçus sous forme d'un chromatogramme et aussi sous forme de séquence nucléotidique. Plusieurs programmes bioinformatiques sont disponibles sur internet pour exploiter au mieux les résultats. La séquence et analysées en utilisant le programme Nucléotide Blast de la base de données NCBI Les analyses et la comparaison phylogénétique sont effectuées sur ClustalW2.

II. Caractérisation de la fongitoxicité des HE vis-à-vis du pathogène

Le cycle de *Colletotrichum* commence par une spore, qui en contact avec la peau d'un fruit, germe en une structure infectieuse appelée appressorium. Ce dernier va pénétrer la cellule hôte et développer un hyphes qui va croître et donner des spores. Les spores vont se propager, germer en hyphes mycéliens qui à leur tour vont parasiter, tuer toutes les cellules du fruit et à nouveau sporuler. Sans contact avec un fruit, une spore va germer en hyphes qui va croître et donner des spores.

Au bout d'un long mis au point, le modèle choisi fut composé de (i) dix huiles essentielles HE (3 concentrations : 0, 250 et 500 μ l) dont une non volatile et peu variable (l'HE de girofle), quatre très volatiles (correspondant aux quatre types chimiques d'HE de *Ravensara aromatica* choisis, à savoir le type limonène, le type sabinène, le type méthyl chavicol et le type méthyl eugénol) et cinq HE offertes par Xeda International (Biox M, Biox CM41, girofle, geraniol et thymol); (ii) une maladie (l'antracnose post-récolte de la mangue). Les HE sont imbibés sur du coton et déposées sur une lame que l'on place sur le couvercle de la boîte de Pétri que l'on renverse par la suite et scelle avec du Parafilm.

Les paramètres étudiés sont la toxicité vis à vis de trois différents stades infectieux de la maladie. Nous avons donc 10 huiles essentielles x 3 concentrations x 3 paramètres x 10 répétitions, soit 900 traitements par jour. Chaque manipulation est suivie quotidiennement par image pendant une semaine (sauf le week-end). Ensuite, on retire le Parafilm tout en maintenant le suivi pendant une autre semaine (pour évaluer la persistance de l'effet en atmosphère non confiné)

1. Caractérisation de la toxicité vis à vis de la croissance mycélienne:

Dans le cas de la toxicité sur la croissance mycélienne, il s'agira (i) d'évaluer les effets des HE sur une portion d'hyphes mycéliens en culture et (ii) de voir la capacité de la portion d'hyphes à croître.

Une portion d'hyphes est prélevée sur une culture veille d'une semaine avec une anse stérile et inoculée sur gélose, du Potato Dextrose Agar (PDA). Elle sera par la suite incubée avec de l'HE dans une étuve maintenue à 28°C pendant deux semaines.

Mesurer in fine pour chaque traitement, la durée d'inhibition totale de la croissance mycélienne (le nombre de jours où aucun mycélium ne se forme dans la boîte), le pourcentage d'occupation de la gélose et en déduire le taux d'inhibition de la croissance mycélienne ($TI = 100 - TC$ et $TG = \frac{\text{Occupation de la gélose}}{\text{Occupation de la gélose dans le témoin}} \times 100$).

2. Caractérisation de la toxicité vis à vis de la germination des spores:

Dans le cas de la toxicité vis à vis de la germination des spores, il s'agit d'évaluer les effets des HE sur des spores en culture :

- (i) A partir d'une culture d'une semaine : inonder la culture de 10ml d'eau distillée stérile, agiter légèrement, recueillir l'eau, filtrer et centrifuger 5 minutes.
- (ii) Reprendre le culot avec 1,5ml d'EDS. Déterminer la concentration avec la cellule de comptage de Mallassez et ramener la concentration à 10^3 spores par ml.
- (iii) Etaler 100 μ l dans une boîte de Pétri. Incuber avec l'HE dans une étuve à 28°C.
- (iv) Mesurer in fine, la durée d'inhibition totale de la germination (le nombre de jour où aucune germination n'a lieu dans la boîte) et déduire le taux d'inhibition de la germination du taux final de germination ($TI = 100 - TG$ et $TG = \text{Germination} \setminus \text{Germination du témoin} \times 100$).

3. Caractérisation de la toxicité vis à vis du développement appressoriale:

Il s'agira de mettre en culture des appressorium produit in vitro et de voir comment évolue la culture à travers la présence ou non de hyphes mycélienne dans la culture. La méthodologie sera adaptée de celui d'Itako et al. en 2013.

a. Production d'appressorium

Une culture sporulante d'une semaine est utilisée.

Plusieurs traitements choisis d'après la littérature ont été effectués sur les spores avant leur incubation en étuve à 32°C :

- (i) Frôler la culture avec une lame stérile que l'on tapote ensuite doucement sur une lame. La lame est déposée dans une boîte de Pétri dont le fond est recouvert de coton imbibé d'EDS (pour assurer 100% d'hygrométrie dans la boîte). Incuber et observer sous microscope chaque jour pendant 2 jours (temps de formation des appressorium).
- (ii) Frôler la culture avec une lame stérile que l'on tapote ensuite doucement sur une lame. Ajouter ensuite de 4 μ l d'éthanol 90° pour éparpiller sans eau (l'alcool s'évapore). La lame est ensuite déposée sur dans une boîte de Pétri donc le fond est recouvert de coton imbibé d'EDS pour assurer 100% d'hygrométrie dans la boîte. Incuber et observer sous microscope chaque jour pendant 2 jours (temps de formation des appressorium).
- (iii) Une goutte d'EDS est étalée sur une lame, que l'on renverse sur une culture sporulante. La lame est ensuite déposée dans une boîte de

Pétri à atmosphère saturé en eau. L'hygrométrie ambiante a été assurée en recouvrant le fond de la boîte de coton imbibé à 100% d'eau (environ 20ml d'ED)

- (iv) La culture est inondée de 10ml d'EDS puis raclée. 20 μ l de la suspension ainsi préparée est étalée sur une lame que l'on déposera dans une boîte de Pétri à atmosphère saturé en eau. L'hygrométrie ambiante a été assurée en recouvrant le fond de la boîte de coton imbibé à 100% d'eau (environ 20ml d'ED).
- (v) La culture est inondée de 10ml d'EDS puis agitée légèrement sans racler. 1ml de la suspension ainsi préparée est centrifugée pendant 5 minutes. Le culot est ensuite repris dans 1,5ml d'EDS. La concentration en spore est ensuite déterminée puis ramenée à 10^3 spores par ml dont 20 μ l sont mises sur une lame que l'on déposera dans une boîte de Pétri à atmosphère saturé en eau. L'hygrométrie ambiante a été assurée en recouvrant le fond de la boîte de coton imbibé à 100% d'eau (environ 20ml d'ED)
- (vi) Extraire la cire cuticulaire d'une peau de banane par immersion (2 minutes) dans du chloroforme. Préparer 50 μ l de suspension de spores comme dans (v) et mélanger avec la solution chloroformique de cire. En étaler 4 μ l sur une lame que l'on incube comme précédemment.
- (vii) Préparer une suspension de spores comme dans (v), diluer ensuite 5 fois pour avoir un nombre faible de spores en solution, en prélever 4 μ l et incuber comme précédemment.
- (viii) Refaire la méthode (vii) en utilisant comme solvant de l'éthanol 70°.
- (ix) Préparer une solution chloroformique de cire comme dans (vi), que l'on réduira ensuite sous rotavapor. Mélanger une pincée (quelques μ g) avec 50 μ l d'une solution de spores préparée comme dans (vii). Vortexer et centrifuger 10 minutes. En déposer 4 μ l sur une lame que l'on incube comme précédemment.
- (x) Préparer une solution chloroformique de cire comme dans (vi), que l'on réduira ensuite sous rotavapor. Déposer et sécher sur une lame. Recouvrir ensuite de 4 μ l de solution de spores préparée comme dans (vii) et incuber.
- (xi) Refaire la méthode (vi, ix, x) en utilisant des mangues à la place de la banane.
- (xii) Préparer un extrait de peau de mangues en macérant à 100°C, 50g de peau de mangues mures avec 50ml d'EDS. Vortexer et centrifuger ensuite 5 minutes à 5000 tour par minutes. Refaire les méthodes (vi,

ix et x) en utilisant l'extrait de mangues à la place de la solution chloroformique.

- (xiii) Refaire les manipulations xii directement sur boîtes de Pétri et non sur lame. Assurer l'humidité en renversant la boîte et en plaçant le coton imbibé d'eau dans le couvercle.
- (xiv) Refaire les manipulations ix en remplaçant la solution chloroformique de cire par l'extrait de peau de mangues et en incubant directement 20µl du mélange dans des tubes Eppendorfs de 1.5ml sans rien ajouter.
- (xv) Préparer une solution de spores comme dans (v) et en prélever 20µL que l'on inocule ensuite directement sur mangues matures. Recouvrir ensuite de coton imbibé d'eau à saturation. Incuber à 20°C. Attendre 2j et observer au microscope.

b. Caractérisation de la toxicité des HE sur le développement des appressoria en mycélium

Préparer une solution de spore à 10^3 spores par ml. Les inoculer sur des mangues matures comme dans la méthode (xiv) de production d'appressorium. Les incuber 2 jours à 20°C et observer la présence d'appressorium sur la zone inoculé au microscope. Découper en petits carrés (de 5cm de côté) la portion de peau de mangues où les appressoria ont été produits.

Déposer cette carré sur du PDA ajouté de chloramphénicol déjà solidifié dans des boîtes de Pétri (appressorium contre gélose). Incuber en présence des trois doses d'HE comme dans (1) et (2). Photographier quotidiennement la culture.

Déterminer in fine le pourcentage d'occupation de la gélose par le mycélium se développant à partir des appressoria. En déduire le taux d'inhibition de la croissance mycélienne comme dans II.2.

Résultats obtenus

I. Technique d'identification des souches :

La technique d'extraction et de purification nous a permis d'obtenir 44 extraits d'ADN provenant des souches de la collection du CIRAD REUNION.

Toutes fois, l'électrophorèse n'a révélé la présence d'aucun fragment d'ADN dans aucun des 44 extraits. Ce qui a empêché la confirmation de la souche utilisée comme étant celle de *Colletotrichum gloeosporioides*

La non-existence de témoin positif ne permet pas de déterminer l'origine cette absence de bande. La confirmation de l'identité de cette souche sera par conséquent finalisée par l'UMR QUALISUD faute de temps).

II. Caractérisation de la toxicité des HE vis-à-vis de la souche responsable de l'antracnose post-récolte des mangues

1. Toxicité vis-à-vis de la germination des spores

Toutes les HE utilisées ont des impacts sur la germination des spores sur PDA. Dans les boîtes témoins, toutes les spores germent dans un délai de 2j après incubation. Aucune inhibition de la germination n'est enregistré pendant cette période.

En présence d'HE, la germination est inhibée. Cette inhibition est totale (100%) et permanente (15j) pour les HE XEDA, partiellement permanente (90<x>100%) et partiellement temporaire pour l'HE de girofle (DI<4), entièrement temporaire pour les HE de *Ravensara aromatica* Sonnerat (TI<70%, DI<6). La meilleure performance enregistré est obtenu avec l'HE à methyl chavicol (60<TI>70%, DI : 4-6j).

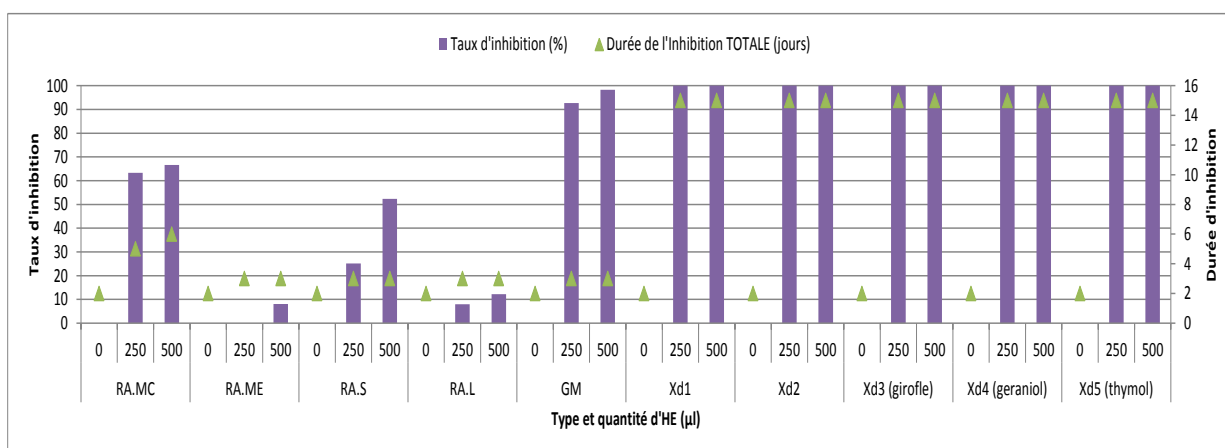


Figure 1 : effet des HE sur la germination des spores

2. Toxicité vis-à-vis de la croissance mycélienne

La toxicité des HE vis-à-vis du mycélium se manifeste surtout par une inhibition de sa croissance. Cette inhibition est totale (ie 100%) et définitive (DI :15j) avec les HE XEDA et l'HE de girofle malgache. Elle est partielle pour les HE de *Ravensara aromatica* où le taux d'inhibition est encore variable entre les différents types d'HE.

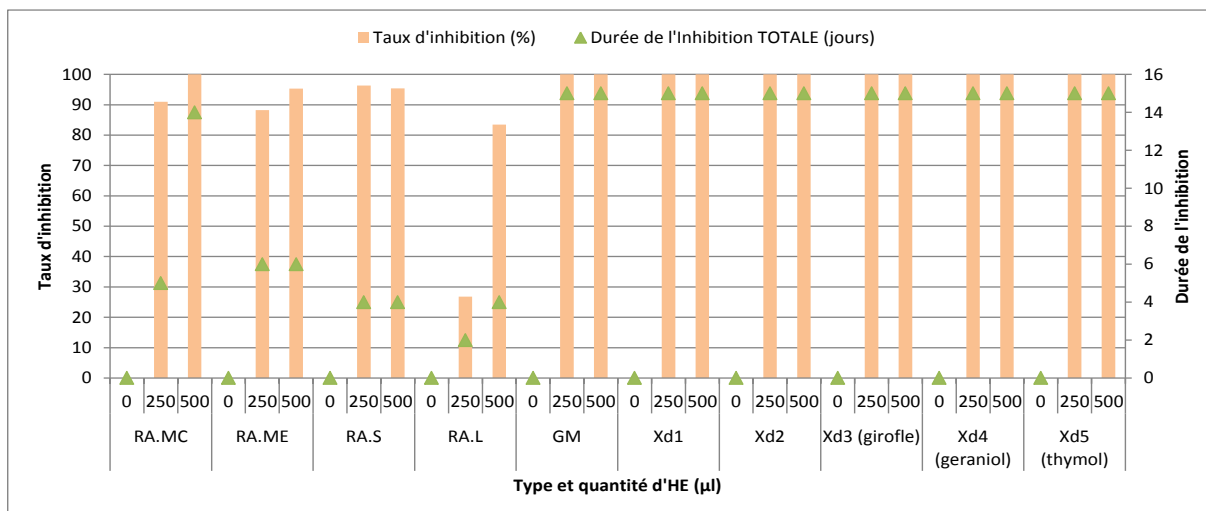


Figure 2 : effet des HE sur la croissance mycélienne

3. Toxicité vis-à-vis de développement mycélien post-appressorial

Aucunes des techniques in vitro n'a permis la germination des spores en appressorium. Tous les essais effectués ont donné des hyphes mycéliens sauf la méthode (xv) où les spores sont inoculées directement sur la peau des mangues.

Les résultats sont les mêmes que pour le mycélium et les spores. L'HE de girofle malgache est celle qui se rapproche des HE XEDA avec lesquelles on obtient une absence totale (TI 100%) et définitive (DI 15j) de mycélium formé à partir des appressorium (inhibition 100%). Les effets obtenu avec *R. aromatica* ne sont pas très éloigné bien que moindre par rapport aux autres.

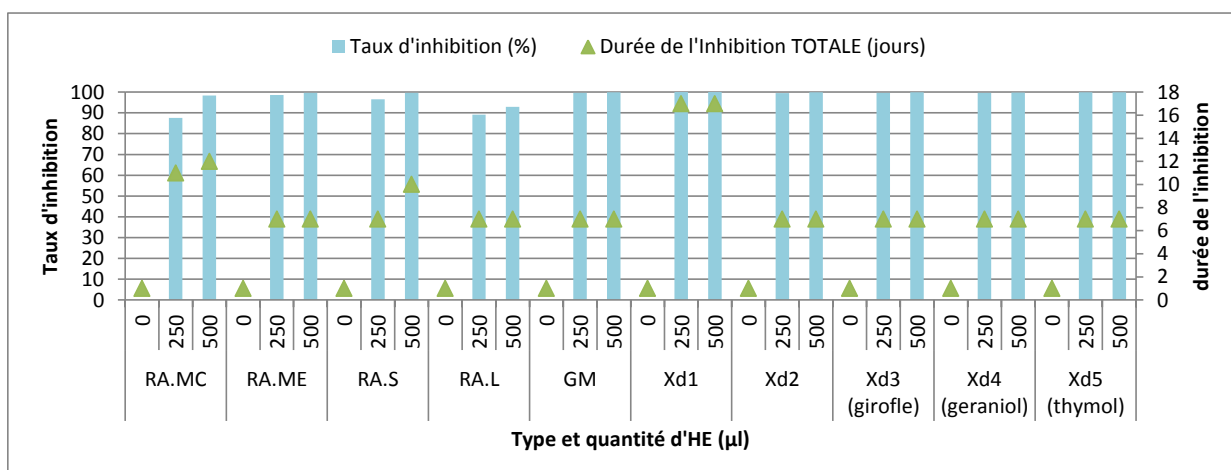


Figure 3 : effet des HE sur le développement de mycélium à partir des appressorium

Conclusion et perspectives

Il se démarque de nos résultats que les HE malgaches sont tout toxiques pour l'agent responsable de l'antracnose post-récolte des mangues réunionnaises. Les toxicités obtenues en présence de ces HE sont tout à fait comparable à celle obtenu avec des HE commerciales déjà sur le marché (Huile Xeda). Une dose de 250 μ l peut déjà donner un effet inhibiteur très notable, cet effet n'est totale (inhibition avoisinant 100%) qu'à 500 μ l bien que la différence ne soit pas très grande (cf fig 1,2,3).

La toxicité des HE de *R. aromatica* vis-à-vis de la germination des spores est temporaire quelque soit le type d'HE utilisée, cela présuppose que l'HE a un effet plus antifongique que fongitoxique. La fréquence de recharge en HE sera probablement élevée pour obtenir une protection à long terme du fruit avec cette HE.

On remarque que l'HE *R. aromatica* de type limonène est la moins toxique vis-à-vis des trois stades de développement que nous avons testés et l'HE de girofle pourrait être la plus pertinente en terme de traitement fongitoxique post-récolte.

Nous pouvons en conclure que les objectifs de notre stage ont été atteints :

- (i) la fongitoxicité des HE qui nous intéressent a été démontrée,
- (ii) le dispositif expérimental pour caractériser la fongitoxicité de nos HE vis-à-vis de l'antracnose des bananes, papayes et mangues malgache est actuellement bien défini.
- (iii) Le protocole d'identification de nos souches une fois à Madagascar est bien acquis.

Les résultats d'analyses des HE que nous avons envoyées chez un prestataire ne nous sont pas encore parvenus. Nous ne pouvons pas interpréter en profondeur mais principalement, ces résultats orientent la suite de nos travaux vers une attention plus particulière sur les HE de girofle et l'HE de *R. aromatica* de type Methyl chavicol. Nous devons encore caractériser les effets de ces HE sur des fruits en stockage, notamment par rapport à leur capacité à prévenir l'antracnose mais aussi par rapport à leur impact sur la qualité oragnoleptique des fruits. La spécificité des actions toxiques observées au type d'HE reste aussi à déterminer.

