

**AFPP – 6^e CONFÉRENCE SUR LES MOYENS ALTERNATIFS DE PROTECTION
POUR UNE PRODUCTION INTÉGRÉE
LILLE – 21, 22 ET 23 MARS 2017**

REPONSES SPECIFIQUES D'HUILES ESSENTIELLES SUR 2 SOUCHES DE *VENTURIA INAEQUALIS*

J. MUCHEMBLED¹, C. DEWEER¹, D. GELIN¹, L. BREHAULT¹, K. SAHMER², P. HALAMA¹

¹ ISA Lille - Institut Charles Viollette

Adaptations aux Stress et Qualité des Végétaux (ASQV)

Biotechnologie et Gestion des Agents Pathogènes en agriculture (BioGAP)

48 boulevard Vauban, 59046 Lille CEDEX, France

jerome.muchembled@isa-lille.fr

² LgCGE - ISA Lille

48 boulevard Vauban, 59046 Lille CEDEX, France

RÉSUMÉ

Dans le cadre d'un projet CASDAR intitulé « évaluation de l'intérêt d'utiliser des huiles essentielles en protection des cultures » (2013-2015), l'étude de l'efficacité de 7 huiles essentielles a été réalisée sur *Venturia inaequalis*, le champignon responsable de la tavelure du pommier. La composition exacte des huiles essentielles a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Chaque huile essentielle possède son ou ses composés majoritaires. Des tests en milieu liquide ont été réalisés afin de calculer non seulement les CI₅₀ des huiles essentielles mais aussi les CI₅₀ de leurs composés majoritaires. Les tests ont été réalisés sur 2 deux souches, sensible et résistante aux fongicides chimiques de la famille des triazoles. Le sulfate de cuivre a été choisi comme substance fongicide minérale de référence. Les CI₅₀ sont produites après 3 répétitions indépendantes. Les résultats montrent que toutes les huiles essentielles et tous les composés majoritaires ont une efficacité biofongicide *in vitro*. Parmi les 7 huiles essentielles, quatre sont plus efficaces que le sulfate de cuivre. Les composés majoritaires ne sont pas forcément plus efficaces que leurs huiles correspondantes : seuls l'eugénol et le carvacrol semblent être plus efficaces sur la souche S. Par contre, la souche R semble plus sensible aux huiles essentielles que la souche S.

Mots-clés : Biocontrôle - huile essentielle - *Venturia* - laboratoire.

ABSTRACT

In a CASDAR project entitled "Evaluation of the interest of using Essential Oils for Crop Protection" (2013-2015), the study of the efficacy of 7 essential oils was carried out on *Venturia inaequalis*, the fungus responsible for apple scab. The exact composition of the essential oils was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry

Each essential oil has its majoritary compound. Liquid tests were performed to calculate not only the IC₅₀ of essential oils but also the IC₅₀ of their majoritary compounds. The tests were performed on two strains, sensitive and resistant to chemical fungicides of the triazoles family. Copper sulfate was selected as the reference mineral fungicidal substance. IC₅₀ are produced after 3 independent repeats.

The results show that all essential oils and all major compounds have *in vitro* biofungicidal efficacy. Among the seven essential oils, four are more effective than copper sulfate. The majority compounds are not necessarily more efficient than their corresponding oils: only eugenol and carvacrol seem to be more effective on the S strain. On the other hand, the R strain seems to be more sensitive to essential oils than the S strain.

Keywords: Biocontrol - essential oil - *Venturia* - laboratory.

INTRODUCTION

La tavelure du pommier (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter) est une maladie répandue et commune dans le monde entier. Cette maladie est présente là où le pommier est cultivé et représente une sérieuse limitation à la production de pommes.

Dans le cadre du développement du biocontrôle, l'utilisation d'huiles essentielles comme substances naturelles d'origine végétale est possible en France depuis quelques années dans quelques cas (huile essentielle de menthe en anti-germinatif pomme de terre, huile essentielle de girofle en maladies de conservation des pommes et des poires, huile essentielle d'orange en insecticide et fongicide sur de nombreux usages). Les huiles essentielles peuvent-elles avoir une efficacité *in vitro* contre *Venturia inaequalis* ?

MATERIEL ET METHODES EVALUATION DES HUILES ESSENTIELLES AU LABORATOIRE

MILIEU DE CULTURE ET VENTURIA

2 souches de *Venturia inaequalis* ont été isolées de la variété GOLDEN (équipe ECOFUN IRHS, INRA, centre Angers-Nantes) : les souches S755 et R552 sont fournies pour être respectivement sensibles et résistantes aux fongicides chimiques de la famille des triazoles (Schnabel *et al.*, 1997 ; Muchembled *et al.*, 2015). Les souches sont conservées et cultivées sur milieu malt agar, sans lumière et à 19°C.

HUILES ESSENTIELLES (HE), LEURS COMPOSES MAJORITAIRES ET LE FONGICIDE MINERAL

Les huiles essentielles évaluées *in vitro* pour leurs propriétés fongicides sont celles d'*Eucalyptus* (*Eucalyptus citriodora*), de girofle (*Syzygium aromaticum*), de menthe (*Mentha spicata*), d'origan (*Origanum compactum*), de sarriette (*Satureja montana*), de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) et de thym (*Thymus vulgaris*). Ces huiles essentielles proviennent de Golgemma. Leur composition a été vérifiée par Chromatographie en Phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG-SM, Varian 3800-Varian Saturn 2000) sur colonne VF-1MS de 30 m x 0,25 mm avec l'hélium comme gaz vecteur. L'identification des composés a été réalisée par rapport à la base de données du NIST (National Institute of Standards and Technology).

Les HE et leur composés majoritaires choisies pour les tests sont *Eucalyptus*/citronellal ; girofle/eugénol ; menthe/ D-carvone et L-carvone ; origan/carvacrol ; sarriette/carvacrol ; tea tree/ terpinene-4-ol et γ -terpinène ; thym/thymol. Le sulfate de cuivre a été testé comme fongicide minéral de référence. Composés majoritaires et sulfate de cuivre proviennent de Sigma.

Suspension de spores

Une suspension de spores à 4.10^4 spores/mL est réalisée à partir de cultures âgées de 20 jours développées sur milieu malt agar à 19°C.

Criblage des huiles essentielles (HE)

Une gamme de 8 concentrations en HE, en composés majoritaires et en sulfate de cuivre est préparée à partir de glucose peptone ; puis, répartie dans des microplaques 96 puits. 8 puits par concentration sont inoculés avec la suspension de spores. Les 4 autres puits serviront de témoin pour calculer la DO nette. Les microplaques sont ensuite scellées et mise en agitation (140 rpm) à 20°C pendant 6 jours (Deweere *et al.*, 2013 ; Stammler *et al.*, 2012).

Lecture des résultats

Elle se fait à 635nm avec un lecteur de microplaques. La DO nette obtenue en fonction des concentrations permet de calculer la CI_{50} (Concentration inhibitrice à 50%) à l'aide d'une régression non linéaire. Les expérimentations sont réalisées au moins trois fois de manière indépendante. Grâce à un programme informatique développé sous R, une CI_{50} avec intervalle de confiance à 95% et F test intégré est calculée en prenant en compte toutes les données de toutes les répétitions (Sahmer *et al.*, 2014). Plus la CI_{50} est faible et plus l'huile essentielle est efficace.

RESULTATS

Le tableau I ci-dessous montre la composition simplifiée des huiles essentielles caractérisées par CPG.

	<u>Eucalyptus</u>	<u>girofle</u>	<u>menthe</u>	<u>origan</u>	<u>sarriette</u>	<u>tea tree</u>	<u>thym</u>
carvacrol				40%	40%		
carvone			60%				
citronellal	71%						
eugénol		92%					
limonène			24%				
g-terpinène				18%	18%	21%	
terpinen-4-ol						39%	
thymol				20%			51%
autres	29%	8%	16%	22%	42%	40%	49%

Tableau I : Composition simplifiée des huiles essentielles analysée par CPG-SM. Simplified composition of essential oils analyzed par GC-MS

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de ces huiles essentielles a montré que les composés majoritaires étaient représentés par le citronellal (71% de l'huile essentielle d'*Eucalyptus citriodora*), l'eugénol (92% de l'huile essentielle de griffe de girofle), la carvone (60% de l'huile essentielle de *Mentha spicata*), le carvacrol (40% des huiles essentielles d'*Origanum compactum* et *Satureja montana*), le terpinen-4-ol (39% de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia*), le thymol (50% de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*).

Effet des huiles essentielles, de leurs composés majoritaires et du CuSO₄ sur la souche sensible triazoles de *Venturia inaequalis*

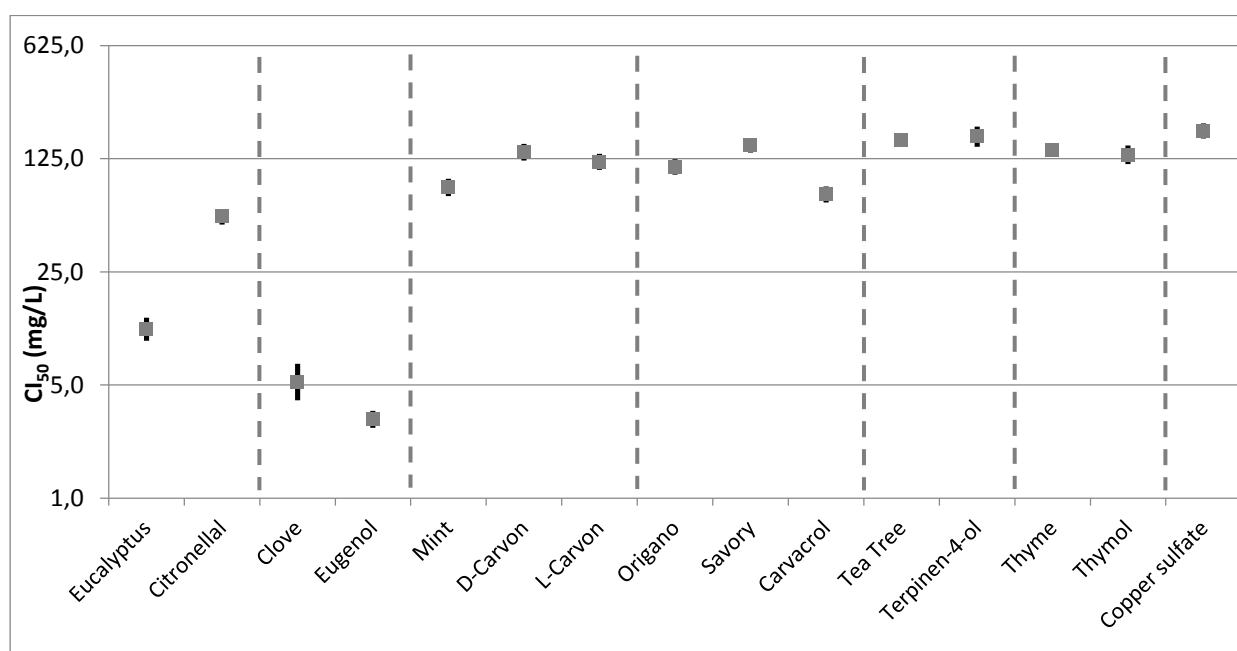


Figure 1 : IC₅₀ des huiles essentielles, de leurs composés majoritaires et du CuSO₄ sur la souche sensible. IC₅₀ of the essential oils and their respective majority compound for the sensitive strain.

La CI_{50} peut être calculée pour chaque substance testée même si la valeur du γ -terpinène est très élevée (2600 mg/L ; donnée non montrée). Les 2 huiles essentielles les plus efficaces sont celles d'eucalyptus et de girofle. Les composés majoritaires ne sont pas toujours plus efficaces que les huiles (citronellal par rapport à l'eucalyptus, la carvone par rapport à la menthe). L'eugénol et le carvacrol sont plus efficaces que leurs huiles sources respectives. Le sulfate de cuivre est beaucoup moins efficace que l'eucalyptus, la girofle, la menthe et le thym mais son action n'est pas statistiquement différente de la sarriette et du tea tree.

Effet des huiles essentielles, de leurs composés majoritaires et du $CuSO_4$ sur la souche résistante triazoles de *Venturia inaequalis*.

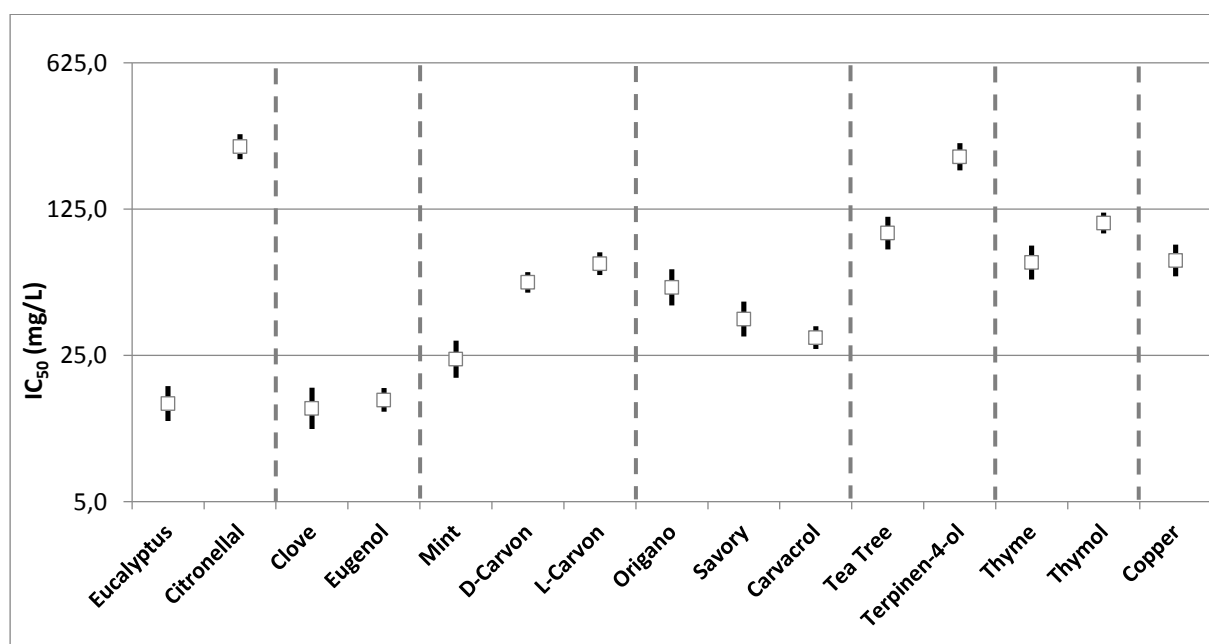


Figure 2: CI_{50} des huiles essentielles, de leurs composés majoritaires et du $CuSO_4$ sur la souche résistante triazole. IC_{50} of the essential oil and their respective majority compound for the resistant triazoles strain.

La CI_{50} peut être calculée pour chaque substance testée. La valeur du γ -terpinène est très élevée (3270 mg/L ; donnée non montrée). Les 3 huiles essentielles les plus efficaces sont celles d'Eucalyptus, de girofle et de menthe. Les composés majoritaires ne sont pas toujours plus efficaces que les huiles (citronellal par rapport à l'eucalyptus, la carvone et la menthe). Les huiles essentielles d'eucalyptus, de girofle, de menthe et de sarriette sont plus efficaces que le sulfate de cuivre. Celles d'origan, de tea tree et de thym sont aussi efficaces que le sulfate de cuivre.

Comparaison de l'effet des huiles essentielles, des composés majoritaires et du sulfate de cuivre sur les 2 souches S et R triazoles de *Venturia inaequalis*

	Souche Sensible		Souche Résistante	
	CI 50	Confidence interval (95%)	CI 50	Confidence interval (95%)
Eucalyptus	11,1	[9,4 - 13,0]	14,8	[12,2 - 17,9]
Citronellal	54,7	[49,0 - 61,1]	248,9	[216,7 - 285,9]
Clove	5,2	[4,0 - 6,7]	14,0	[11,1 - 17,5]
Eugenol	3,1	[2,7 - 3,5]	15,3	[13,4 - 17,5]
Mint	83,1	[73,5 - 94,1]	24,0	[19,6 - 29,5]
D-Carvone	137,3	[122,0 - 154,5]	55,9	[49,9 - 62,6]
L-Carvone	119,6	[106,8 - 133,9]	68,7	[60,6 - 77,8]
Oregano	111,3	[99,9 - 124,1]	52,9	[43,3 - 64,6]
Carvacrol	75,2	[67,1 - 84,3]	30,5	[26,9 - 34,5]
Savory	151,3	[136,7 - 167,3]	37,4	[30,9 - 45,2]
Carvacrol	75,2	[67,1 - 84,3]	30,5	[26,9 - 34,5]
Tea Tree	163,1	[148,5 - 179,0]	96,2	[80,4 - 115,2]
Terpinen-4-ol	170,9	[148,1 - 197,2]	222,4	[191,4 - 258,5]
γ -Terpinene	2649,1	[2311,4 - 3036,1]	3271,2	[3021,9 - 3541,1]
Thyme	141,9	[130,0 - 155,0]	69,6	[57,7 - 83,9]
Thymol	132,2	[115,8 - 151,0]	107,4	[95,8 - 120,5]
Copper	185,91	[167,2 - 206,71]	71,08	[59,68 - 84,66]

Tableau II : CI₅₀ des huiles essentielles, des composés majoritaires et du sulfate de cuivre sur les 2 souches. IC₅₀ of essential oils, predominant compounds and copper sulfate on 2 strains.

Les huiles essentielles les plus efficaces sont l'Eucalyptus et la girofle. La girofle est plus efficace sur la souche sensible que sur la souche résistante et cette différence n'est pas observée pour l'eucalyptus. Pour les autres modalités, les huiles essentielles sont plus efficaces sur la souche résistante que sur la souche sensible. Cette différence est aussi observée pour l'action du cuivre.

Parmi les composés majoritaires, l'eugénol est le plus efficace sur les 2 souches, avec une plus grande efficacité sur la souche sensible triazoles. Ensuite c'est le carvacrol qui est le plus efficace sur la souche résistante et le citronellal sur la souche sensible. Il n'y a pas de différence significative pour la D-carvone et la L-carvone sur les 2 souches. D-carvone et la L-carvone sont cependant plus efficaces sur la souche résistante par rapport à la souche sensible. Le γ -terpinène est le composé le moins efficace sur les 2 souches tandis que terpinen-4-ol et thymol ont des efficacités similaires sur les 2 souches.

DISCUSSION

Les résultats montrent que les huiles essentielles, leurs composés majoritaires et le sulfate de cuivre présentent une activité biofongicide sur les 2 souches de *Venturia inaequalis*.

En ce qui concerne la sensibilité/résistance des souches, il faut noter la plus grande sensibilité au sulfate de cuivre de la souche R triazoles par rapport à la souche S. La girofle et l'eucalyptus sont les huiles essentielles les plus efficaces alors que l'huile essentielle la moins efficace est celle de tea tree. La souche

R triazoles est systématiquement beaucoup plus sensible à 5 des 7 huiles essentielles (menthe, origan, sarriette, tee tree, thym) que la souche S triazoles.

Les composés majoritaires ne sont pas plus efficaces que les huiles essentielles sauf pour l'eugénol et le carvacrol sur la souche S.

L'action de l'eugénol sur les membranes des organismes procaryotes se produit principalement par une perméabilisation non spécifique. La perméabilisation non spécifique de la membrane plasmique a été démontrée dans plusieurs études en observant l'augmentation du transport de potassium et de l'ATP hors des cellules (Hemaiswayra et Doble, 2009). Sur les organismes fongiques, la compréhension des mécanismes d'actions de l'eugénol nécessite plus d'approfondissement, néanmoins son action sur *S. cerevisiae* démontre une action sur les membranes plasmiques induisant une fuite du contenu cellulaire. Selon Géza *et al.* (2014), l'eugénol inhibe la germination des spores ainsi que la croissance mycélienne sur *Venturia inaequalis*. Nos résultats sont en adéquation avec ces affirmations, l'eugénol se révèle être le composé le plus efficace sur *Venturia inaequalis*.

Il y a une différence d'action entre le carvacrol et le thymol sur les 2 souches, alors qu'ils sont isomères (figure 3). Ces phénols monoterpénoïdes sont impliqués dans la perméabilisation de la fluidification membranaire (Sikkema, J *et al.*, 1995). Le groupement OH pourrait être moins accessible dû à l'encombrement de la molécule pour le thymol par rapport au carvacrol.

Au niveau du mode d'action des huiles essentielles, elles peuvent provoquer dans les cellules eucaryotes la dépolarisation des membranes mitochondriales, affectant le cycle calcique (Richter and Schweizer, 1997 ; Bakkali *et al.*, 2008), les pompes à protons ainsi que le pool d'ATP (effet similaire sur les bactéries). Ces dépolarisations entraînent des pertes cellulaires (protéines, ions calciques...) responsables de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose (Yoon *et al.*, 2000 ; Bakkali *et al.*, 2008). L'action fongicide des HE étant attribuée majoritairement à la dépolarisation des membranes mitochondriales, il est possible de soumettre l'hypothèse que les membranes de la souche S seraient d'une composition différente de celle de la souche R, la membrane de la souche R étant plus perméable aux huiles essentielles que la membrane de la souche S.

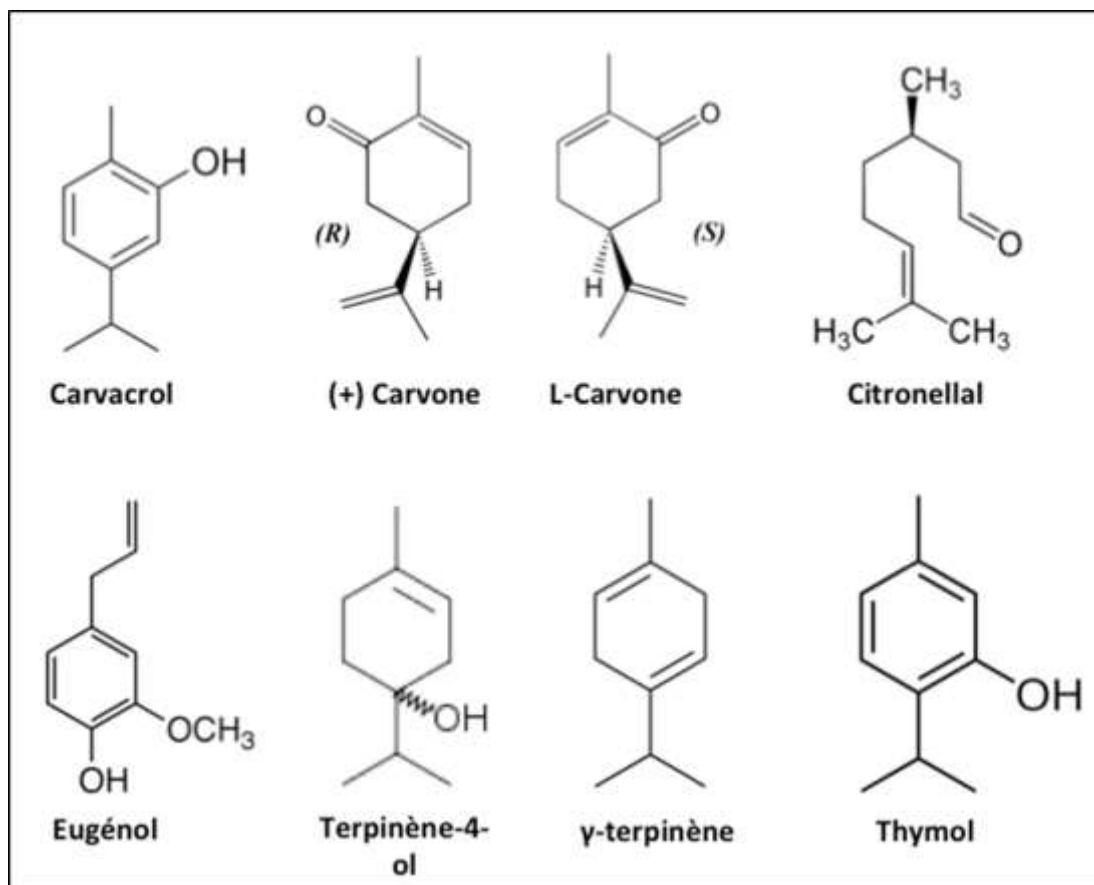


Figure 3 : Formules des composés majoritaires testés / Formula of major compounds used

CONCLUSION

À notre connaissance, très peu d'études ont été réalisées sur l'action des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires sur *Venturia inaequalis* en milieu liquide. La modélisation au laboratoire de l'efficacité des huiles essentielles par le calcul d'une CI_{50} avec intervalle de confiance à 95% permet de montrer des différences significatives entre les huiles essentielles, leurs composés principaux et les souches testées.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la forêt pour le cofinancement de cette étude (CASDAR).

BIBLIOGRAPHIE

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Deweert, C., Yaguiyan, A., Muchembled, J., Sahmer, K., Dermont, C., and Halama, P. (2013) In vitro evaluation of dill seed Essential Oil antifungal activities to control *Zymoseptoria tritici*. 65th International Symposium on Crop Protection, Ghent, Belgium. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 489-496.
- Géza, N., Hochbaum, T., Sarosi, S., and Ladanyi, M. (2014). In Vitro and in Planta Activity of Some Essential Oils against *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 42, 109–114.

- Hemaiswarya, S., and Doble, M. (2009). Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16, 997–1005.
- Montag, J., Schreiber, L., and Schönherr, J. (2006). An in vitro study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. *Journal of Phytopathology* 154, 474–481.
- Muchembled, J., Corroyer, N., Deweer, C., Dupont, N., Sahmer, K., Halama, P., Larrieu, J.F., Le Maguet, J., Navarro, J.M., Tournant, L., and Vidal, R. (2015) Evaluation in laboratory and in orchards of the effectiveness of essential oils on *Venturia* sp. AFPP, p67 à p77, 5th International Conference on Alternative Methods of Crop Protection 11th, 12th & 13th of March 2015, Lille, France.
- Richter, C., and Schweizer, M. (1997). Oxidative stress in mitochondria. *Cold Spring Harbor Monograph Archive* 34, 169–200.
- Sahmer, K., Deweer, C., Muchembled, J., and Halama, P. (2014) Utilisation d'une régression non linéaire pour comparer l'efficacité d'huiles essentielles en tant que biofongicides. 46^{èmes} Journées de Statistique, Rennes (France). 6 p.
- Schnabel, G., Parisi, L. (1997) Sensitivity of *Venturia inaequalis* to five DMI fungicides, including the new triazole fluquinconazole, and to pyrimethanil. *Z Pflanzenk Pflanz* 104:36–46.
- Sikkema, J., De Bont, J. A. M., and Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.
- Stammler, G. Taher, K., Koch, A., Haber, J., Liebmann, B., Bouagila, A., Yahyaoui, A., Nasraoui, B., (2012) Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates from Tunisia to epoxiconazole and pyraclostrobin. *Crop Protection*, 32-36.
- Yoon, H.S., Moon, S.C., Kim, N.D., Park, B.S., Jeong, M.H., and Yoo, Y.H. (2000). Genistein Induces Apoptosis of RPE-J Cells by Opening Mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 151–156.