



Biodiversité
Agriculture
Alimentation
Environnement
Terre
Eau



Evaluation et compréhension des propriétés antifongiques des propolis

Réunion - Animation Scientifique DPP COSAQ

07-03-2017

Saint-Pierre – La Réunion

Auriane Dudoit Verhaeghe

Directeur de thèse : Pierre Brat

Encadrant : Marc Chillet

Directeur scientifique entreprise Pollenergie : Nicolas Cardinault

Partenaires impliqués – Convention CIFRE

Thèse
confidentielle

Laboratoire d'accueil :

CIRAD, UMR
Qualisud
(Montpellier)



Partenaire industriel :

Société **Pollenergie**
(Saint Hilaire de
Lusignan, 47)



Activité de l'entreprise



Développement et commercialisation d'une gamme de compléments alimentaires et cosmétiques BIO destinée UNIQUEMENT à des **pathologies humaines** (antiviral, antirhumatismal, anxiolytique, etc)

Le projet de thèse

Contexte

- Propolis : **nombreuses propriétés thérapeutiques** connues
- => Peu de travaux réalisés sur l'action antifongique appliquée spécifiquement à des **souches phytopathogènes**

Objectifs

- **Sélectionner** sur des bases microbiologiques une variété de propolis présentant une bonne activité antifongique
- **Identifier** / caractériser les fractions associées à ces effets antifongiques
- **Incorporer** la fraction active dans une forme utilisable commercialement pour le traitement des fruits en post-récolte

But

- Mise sur le marché d'un extrait actif - Dépôt de **brevet** en fin de thèse (2017)
- Amélioration qualité / durée de **conservation des fruits** lors du traitement **post-récolte**

Analyses chimiques

Etude microbiologique *in vitro*

Etude approfondie

Etude microbiologique *in vivo*

Echantillons de propolis

Généralités

Qu'est ce que le propolis : substance résineuse récoltée par les abeilles sur les bourgeons et écorces de certains arbres et arbustes

Composition chimique (près de 400 composés) : résines (polyphénols...), cire, huiles essentielles (sesquiterpènes, terpenoïdes...), pollen, substances organiques et minérales ...

Analyses chimiques

Etude microbiologique *in vitro*

Etude approfondie

Etude microbiologique *in vivo*



P5

Propolis verte
(*Baccharis dracunculifolia*)



P6

Propolis rouge
(*Dalbergia*)



P3

Propolis verte
(*Baccharis dracunculifolia*)



P4

Propolis brune
(*Populus nigra*)



P1

Propolis brune
(*Populus balsamifera* L.)



P2

Propolis brune
(*Populus nigra*)

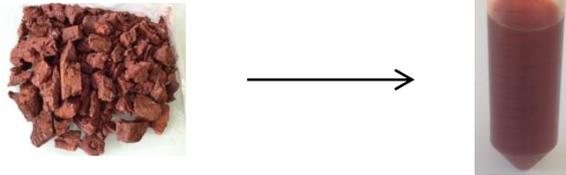


Riche en composés polyphénoliques

➤ **activité antifongique**

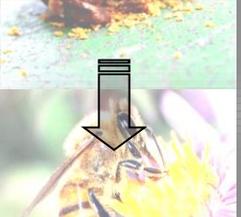
Préparation des Extraits Ethanoliques de Propolis (EEP)

- Optimisation de l'extraction des polyphénols d'extraits de propolis (temps d'extraction, ratio, facteur de dilution...)



- Mise au point de la méthode d'analyse des polyphénols par HPLC (solvants, gradient d'élution...)
- Mise au point de la méthode d'analyse des composés volatiles par SPME-GC/MS (type de fibre, temps d'équilibration, température d'extraction...)

Profils chromatographiques des extraits éthanoliques de propolis



Origine France



P1

Propolis brun (*Populus balsamifera* L.)



P2

Propolis brun (*Populus nigra*)



P4

Propolis brun (*Populus nigra*)



P3

Propolis verte (*Baccharis dracunculifolia*)



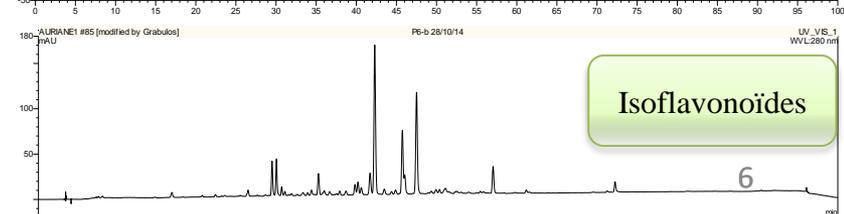
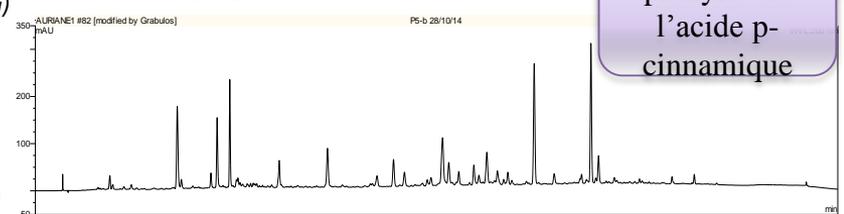
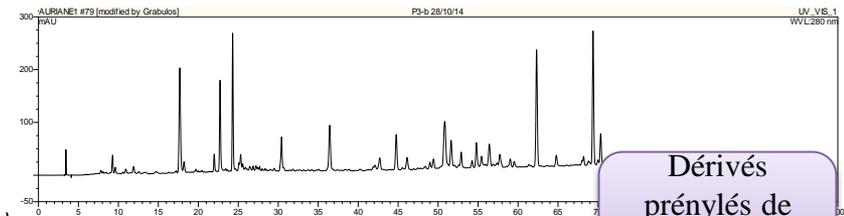
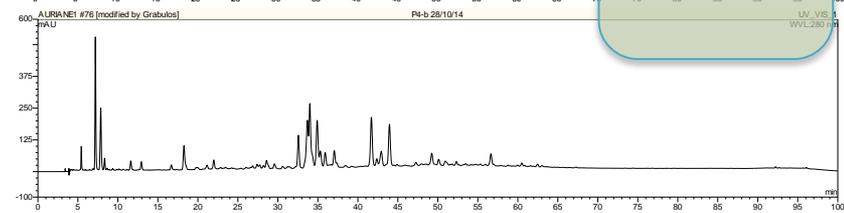
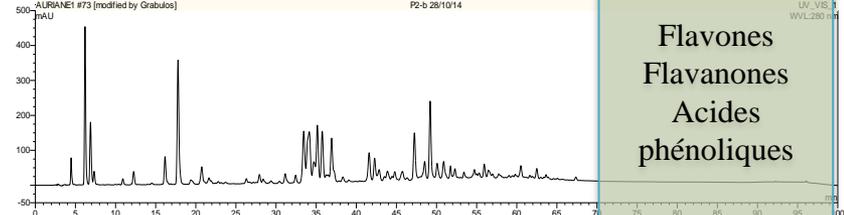
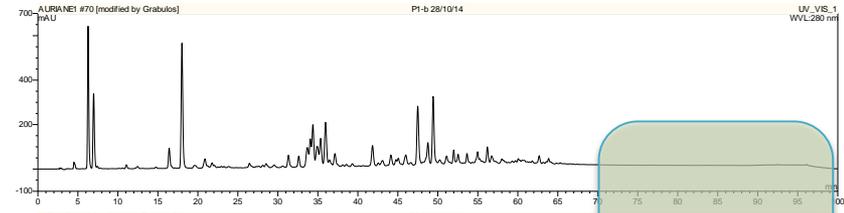
P5

Propolis verte (*Baccharis dracunculifolia*)



P6

Propolis rouge (*Dalbergia*)



Flavones
Flavanones
Acides
phénoliques

Dérivés
prénylés de
l'acide p-
cinnamique

Isoflavonoïdes

Exemple de caractérisation des EEP

Extraits de propolis de peuplier

N° Pic	Tr (min)	λ max	[M-H]	MS ² /MS ³	P1	P2	P4	Composés
1	4,7	300sh, 326	179	135	oui	oui	oui	caffeic acid
2	6,7	312	163	119	oui	oui	oui	para coumaric acid
3	7,4	282, 320sh	135	119, 107, 93	oui	oui	UV 296, 324	dihydroxyvinylbenzène
4	8	300sh, 328	193		oui	oui	oui	isoferulic acid
5	11,6	241, 276	431	268 MS3 (268) : 239, 211	oui	oui	oui	
6	13,2	300sh, 325	299	284 MS3 (284) : 255, 227	oui	oui	oui	
7	14,1	252, 367	329	314 MS3 (314) : 299, 285, 271, 257, 243	oui	oui	non	trihydroxy dimethoxy flavone
8	15,6	258, 373	301	179, 151	oui	oui	oui	quercétine
9	17,2	290	285	267 MS3 (267) : 252, 223, 239	oui	oui	oui	pinobanksin-5-methylether
10	17,6	258, 300sh, 359	315	300 MS3 (300) : 271, 255, 243	oui	oui	oui	quercetin -3-methylether
11	18,7	279	147		oui	oui	oui	cinnamic acid
12	20,6	270, 338	269	225, 151	oui	oui	oui	apigénine
13	21,8	273, 295, 366	271/285	ms 271 : 253 MS3 (253) : 225, 197, 209	oui	oui	oui	pinobanksin ✓
14	22,8	258, 315, 372	315/383	ms 383 : 163 MS3 (163) : 119	oui	oui	UV 314, MS 383	para coumaric acid derivative
15	24	269, 300sh, 350	299	284 MS3 (284) : 255, 227	oui	oui	non	luteolin-methylether
16	24,3	250, 300sh, 325	457	295 MS3 (295) : 235, 161	oui	oui	oui	acetyl dicafeoyl glycerol
17	25	258, 296sh, 358	329	314 MS3 (314) : 285, 299, 271, 243, 257	oui	oui	non	quercetin-dimethylether
18	27,5	263, 303sh, 354	283	268, 239, 211	oui	oui	445 dans P4	galangine 5 méthylether
19	29,1	257, 372	315	300 MS3 (300) : 271, 283, 243, 151	oui	oui	non	quercetin -7-methylether
20	29,5	317	441	381, 295, 179, 163 MS3 (163) : 119	oui	oui	oui	acetyl para coumaroyl cafeoyl glycerol
21	30,4-30,5	247, 302sh, 332	329/471	ms 329 : 314 MS3 (314) : 299, 285, 271	oui	oui	pas 329 dans P4	quercetin-dimethylether
22	31,6	260, 355	329	314 MS3 (314) : 299, 285, 271	oui	oui	non	quercetin-dimethylether VOIR uv 300SH?
23	32,3	288	287	181 MS3 (181) : 166, 139	oui	oui	oui	
24	33,6	270, 312	nd		oui	oui	oui	
25	34,3	303sh, 329	247	179, 135	oui	oui	oui	caffeic acid prenyl ester
26	34,7	270	253	209	oui	oui	oui	chrysin ✓
27	35	315	425	163 MS3 (163) : 119	oui	oui	oui	2-acetyl-1,3-di[ε-p-coumaroyl]glycerol
28	35,3	289, 320sh	287	243 MS3 (243) : 228, 199, 161, 122	oui	269 MS2 : 225, 177	oui	287 : tétrahydroxyflavone
29	35,8	291	285	243 MS3 (243) : 228, 215, 200, 156	oui	oui	non	
30	36	322	455	395 MS3 (395) : 163, 193, 351, 119	oui	oui	oui	acetyl para coumaroyl feruloyl glycerol
31	36,3	292	255	213, 151	oui	oui	oui	pinocembrine ✓
32	36,9	266,315sh, 360	257/269	ms 269 : 227, 197	oui	oui	pas 257 dans P4	galangine ✓
33	37,4	269, 320sh, 369	299	284 MS3 (284) : 151, 227, 255	oui	oui	oui	kampférol méthyl ether
34	38	296	313	271, 253	oui	oui	oui	pinobanksin -3-O-acétate
35	38,3	302sh, 329	283	179, 135	oui	oui	oui	CAPE
36	39,5	268, 312sh, 340sh	283	268, 179, 135 MS3 (268) : 239, 211	oui	oui	oui	methoxychrysin
37	42,7	315	nd		oui	oui	oui	
38	43,4	295sh, 329	295	251 MS3 (251) : 235, 159, 173	oui	oui	oui	caffeic acid cinnamyl ester
39	44	302sh, 327	nd		oui	oui	oui	
40	45	269, 296sh	327	253 MS3 (253) : 209, 165, 225	oui	oui	oui	pinobanksin -3-O-propionate
41	45,5	269, 362	419	313, 299, 193	oui	oui	non	ferulic acid derivative
42	45,9	314	299	163 MS3 (163) : 119,135	oui	431 dans P2	431 dans P4	para coumaric acid derivative
43	46,7	345	269	254 MS3 (254) : 225, 177, 163	oui	oui	non	hydroxy methoxy flavone
44	46,9	288	301	283 MS3 (283) : 268, 253	oui	oui	oui	
45	47,5	266, 312sh, 369	401/417	ms 401 : 281 MS3 (281) : 253, 183, 209, 165	oui	oui	non	
46	48,3	289, 325sh	419	313 MS3 (313) : 269, 192, 203	oui	oui	oui	ferulic acid derivative
47	49,5	270, 292	389	283 MS3 (283) : 239, 265, 151	oui	oui	non	
48	50,3	255, 315	279	235, 162 pas de 162?	oui	oui	oui	
49	51,2	251, 296, 326	341	253 MS3 (253) : 209, 165, 225	oui	oui	oui	pinobanksin -3-O-butyrate ou isobutyrate
50	52	291, 326sh	565	471 MS3 (471) : 456, 350, 336, 309, 229	oui	oui	mélange dans P4	
51	52,9	267, 294 sh	551	299 MS3 (299) : 284, 178, 137	oui	oui	oui	
52	53,2	264, 357	535	441 MS3 (441) : 423, 309, 335, 257	oui	oui	non	ni
53	53,4	266, 296	521	269 MS3 (269) : 251, 137, 178, 225	oui	oui	non	ni
54	55,8	272, 285sh	403	ms 403 : 385, 373 MS3 (385) : 370, 355, 313, 291, 253	oui	oui	non	ni
55	56,1	265, 348	401	281, 295 MS3 (281) : 266, 238	oui	355 dans P2 (adduit?)	non	ni
56	57,1	275sh, 296	403	297, 283 MS3 (297) : 282, 178, 279	oui	oui	oui	ni
57	57,6	276, 293	551	299 MS3 (299) : 284, 178, 281, 137	oui	oui	oui	
58	58,2	276, 292	403	253 MS3 (253) : 209, 238, 225, 175	non	non	oui	pinobanksin-3-O-phenylpropionate
59	58,8	272, 290	521	415, 389, 283, 269 MS3 (269) : 251, 137, 225, 163	oui	oui	non	ni
60	65	267, 301sh, 348	533	281 MS3 (281) : 266, 248	oui	579 dans P2	non	ni



P1

Propolis brune (*Populus balsamifera* L.)



P2

Propolis brune (*Populus nigra*)



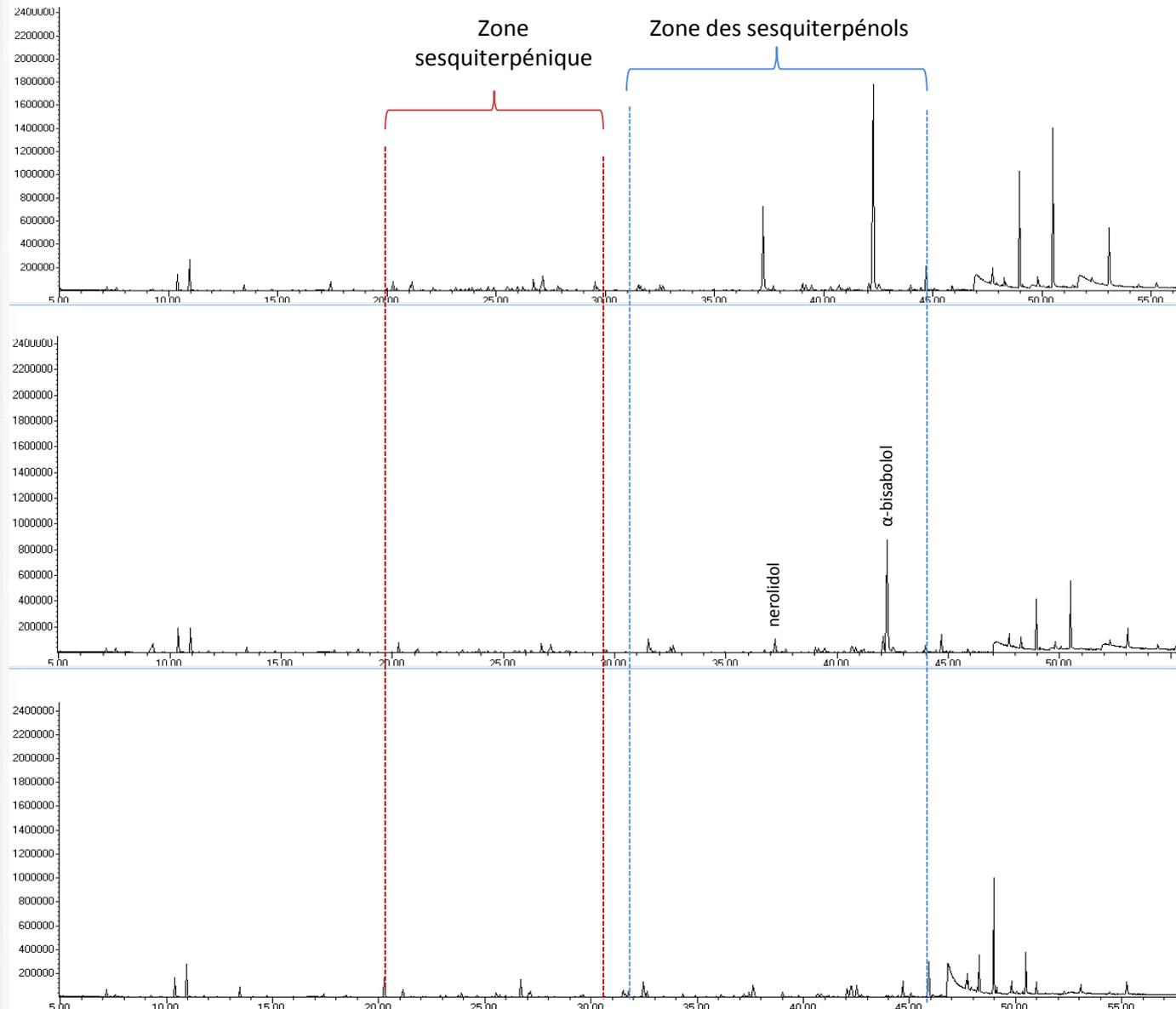
P4

Propolis brune (*Populus nigra*)

✓ Composés antifongiques

5. Composés volatiles

Détermination du profil aromatique et semi-quantification par SPME-GC/MS



France

P1

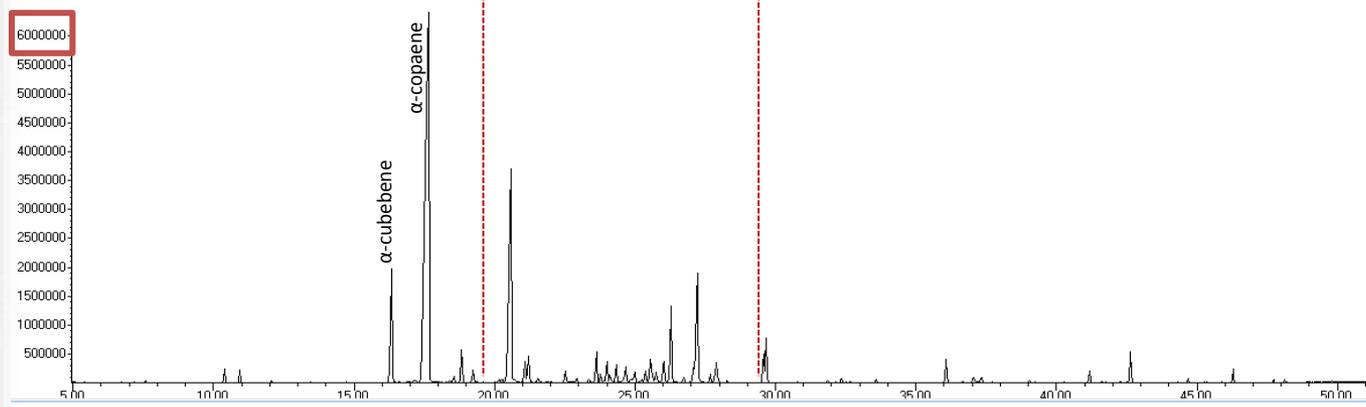
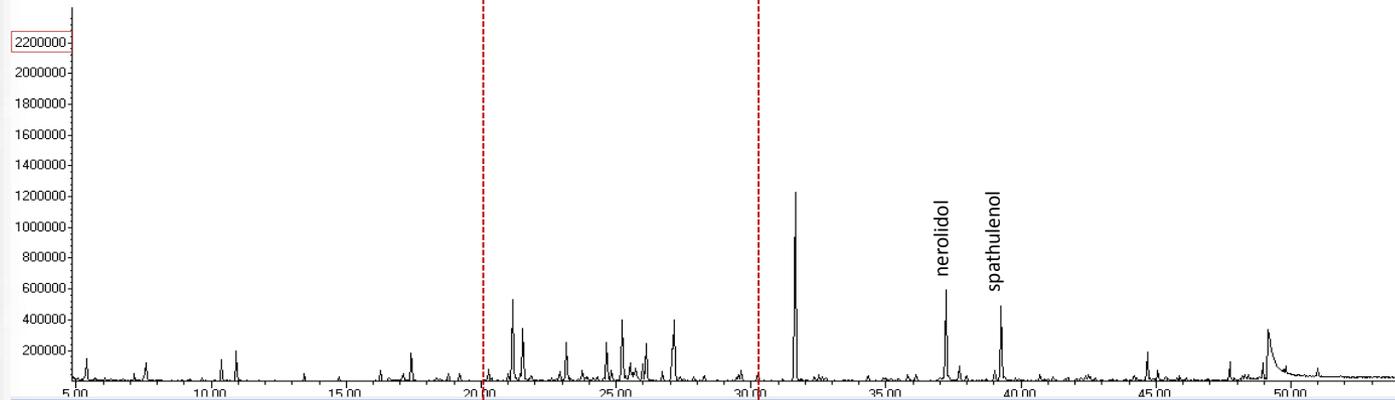
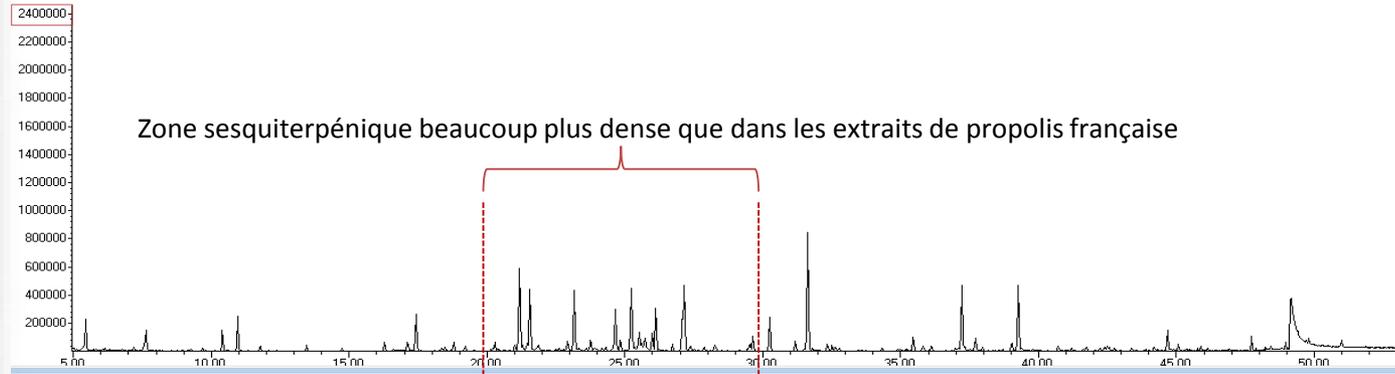
P2

P4

* Colonne capillaire DB-Wax, fibre SPME PDMS, étalon interne 3-heptanol

5. Composés volatiles

Détermination du profil aromatique et semi-quantification par SPME-GC/MS



*Colonne capillaire DB-Wax, fibre SPME PDMS, étalon interne 3-heptanol

Brésil

P3

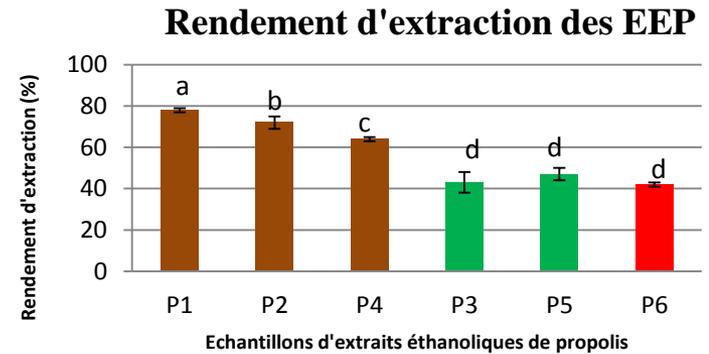
P5

P6

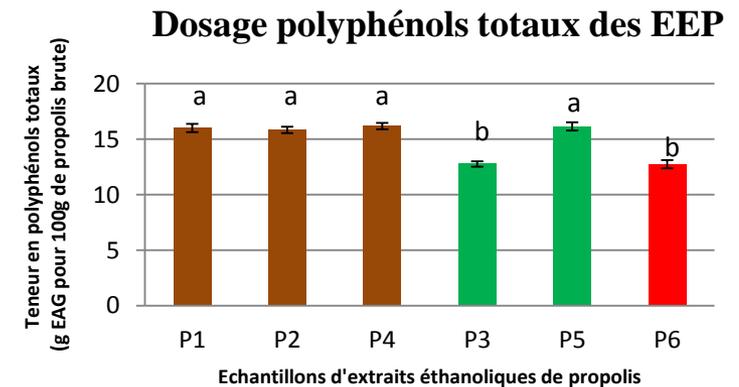
Analyses complémentaires



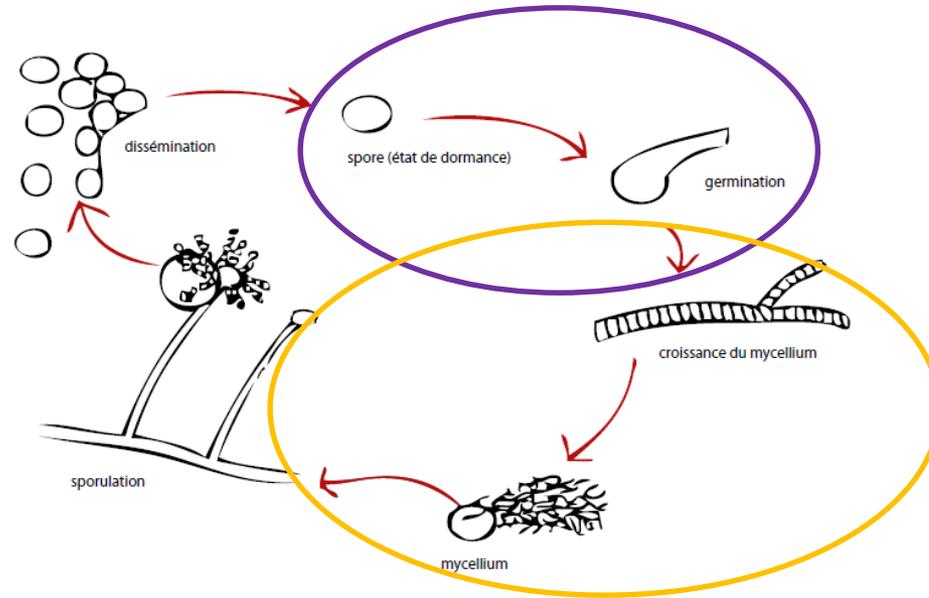
➤ Rendement d'extraction



➤ Teneur en polyphénols totaux
Méthode de dosage Folin-Ciocalteu



Evaluation de l'activité antifongique *in vitro*



Cycle de développement d'un champignon



Photo : spore germée de *Colletotrichum musae* observée au microscope grossissement 100



Photo : mycélium de *Colletotrichum musae* observé au microscope grossissement 100

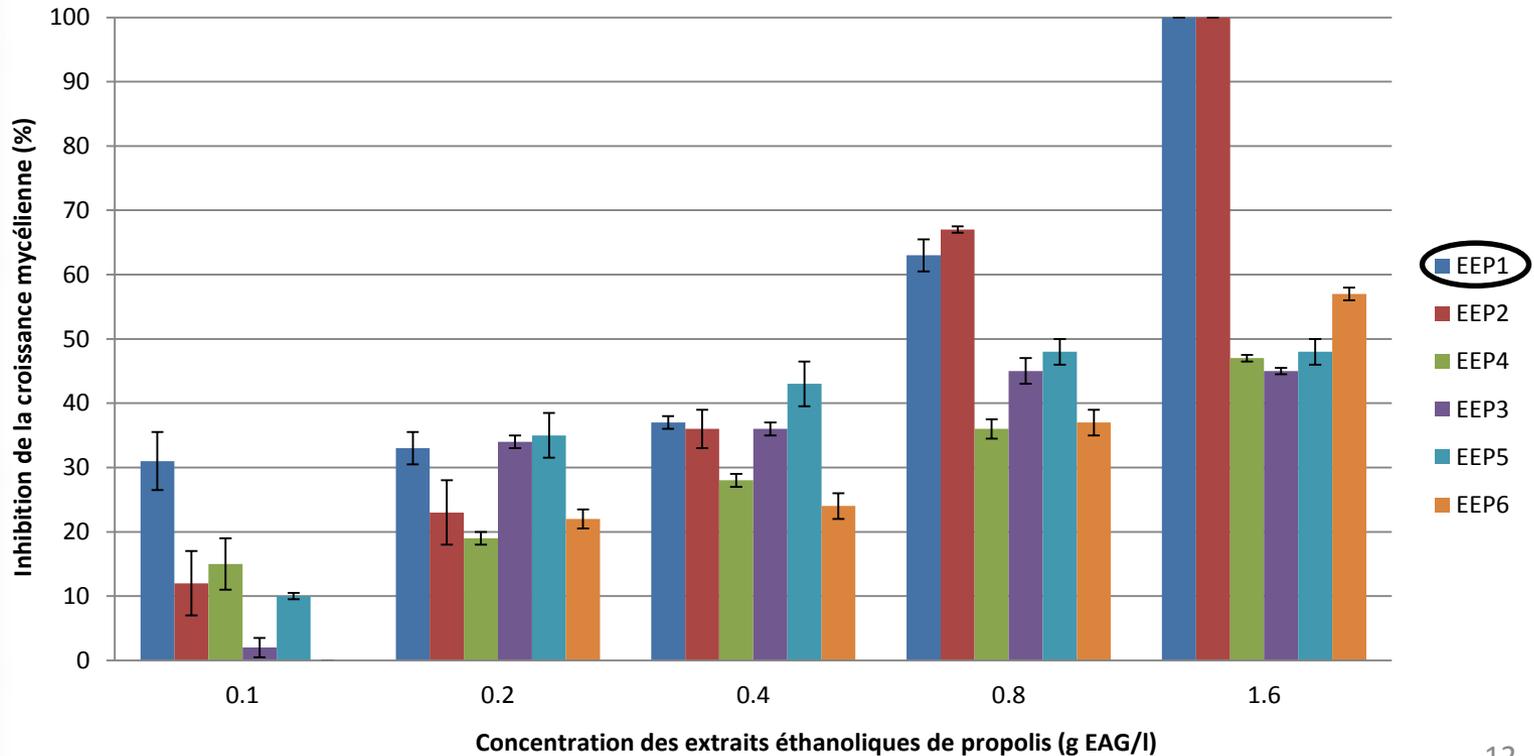
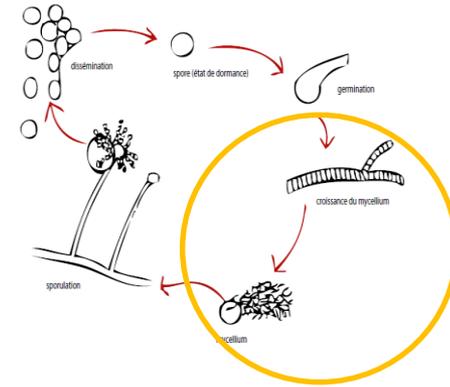
Stades de développement du *Colletotrichum musae*, isolé de la pourriture de couronne de la banane*

- Germination des spores
- Croissance mycélienne

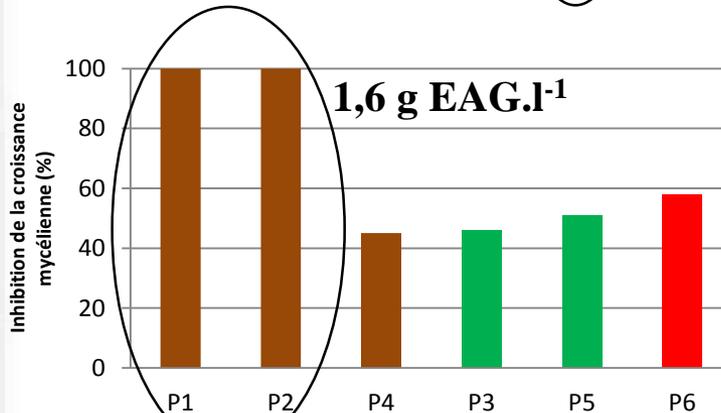
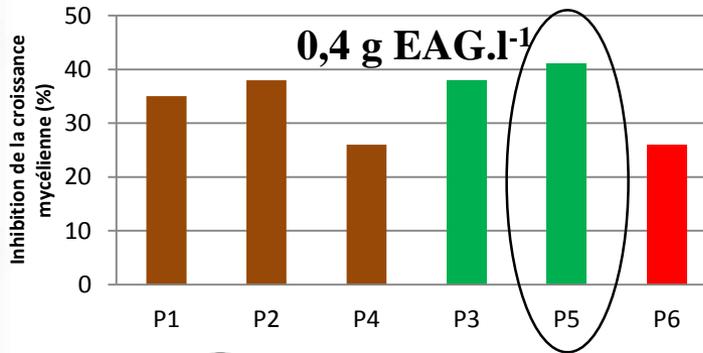
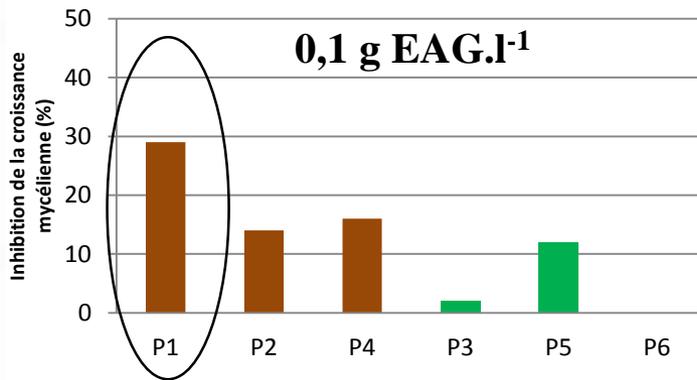
*UMR BGPI CIRAD Montpellier (Luc de Lapeyre de Bellaire)

Evaluation de l'activité antifongique *in vitro*

➤ Croissance mycélienne



Croissance mycélienne



- Effet dose
- Même teneur en PPT, même composition chimique, même valeur de pH ➔ ≠ activité

Hypothèses

Variabilité quantitative de certains composés polyphénoliques

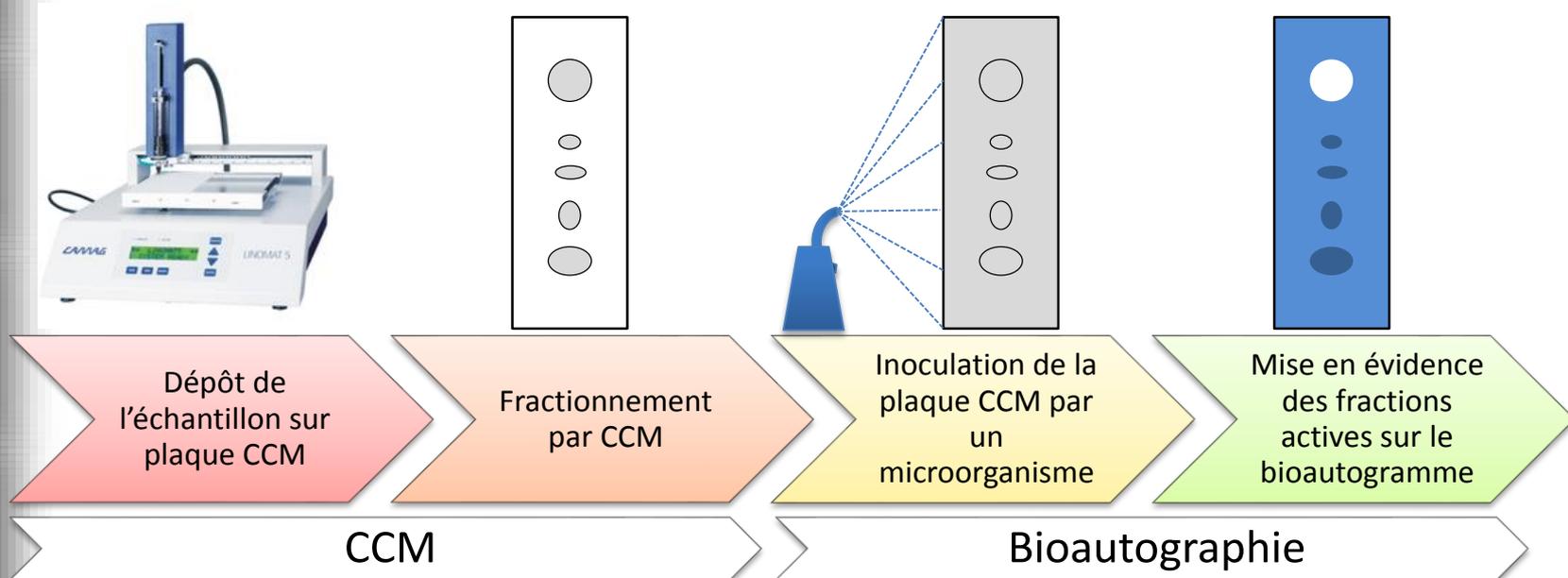
Synergie/antagonisme entre polyphénols

Synergie/antagonisme entre polyphénols et composés volatiles

La CCM bioautographique ^{1,2}

↳ Outil permettant la détection de composés antimicrobiens au sein d'un extrait / matrice complexe

Schéma général



¹ David E. Wedge et al. A new 2D-TLC Bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1050-1054

² Soro D; et al. Evaluation de l'activité antifongique par bioautographie de quelques plantes médicinales de Côte d'Ivoire contre deux formes spéciales de *Fusarium oxysporum*. *Agronomie Africaine.* **2012**, 24 (1) : 19-28

La CCM bioautographique agar overlay

Généralités

Analyses chimiques

Etude microbiologique *in vitro*

Etude complémentaire

Etude microbiologique *in vivo*



Photo : Extrait éthanolique de propolis rouge du Brésil



Photo : plaque CCM éluée

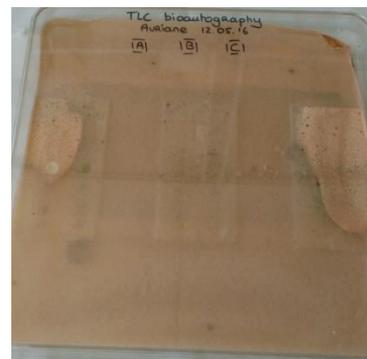


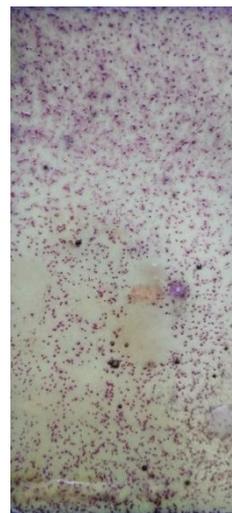
Photo : bioautogramme avant révélation chimique



Photo : bioautogramme après révélation chimique

CCM

bioautographique agar overlay



Photos présentant des problèmes de contamination et de concentration en spores

Optimisation des conditions opératoires :

- Solution EEP : ratio d'extraction 1:10 (w/v)
- Enceinte : 85% humidité, 25°C +/- 1°C
- Traitement MTT à J+4 : concentration 2,5mg/ml (incubation 4h - T°C ambiante)
- Plaque CCM : phase normale Silica Gel 60
- Longueur du dépôt : 6mm
- Solvant d'éluion : toluène/acétone (3/1) (v/v)
- Dimension des plaques : 5x10cm



a



b



c

Photos a : bioautogramme P1 (80 µg EAG pour 100g de propolis brute)
 b : bioautogramme P5 (320 µg EAG pour 100g de propolis brute);
 c : bioautogramme P6 (64 µg EAG pour 100g de propolis brute)

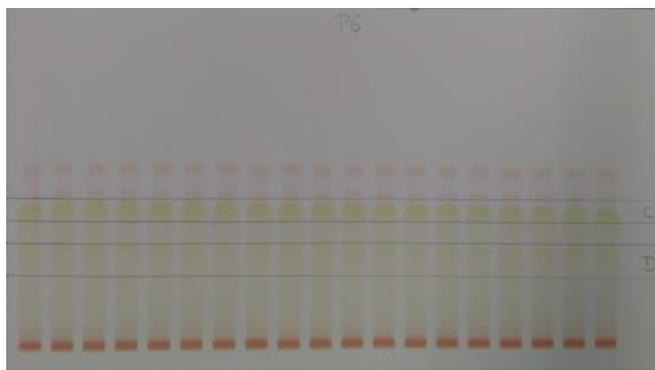
La CCM bioautographique **agar overlay**



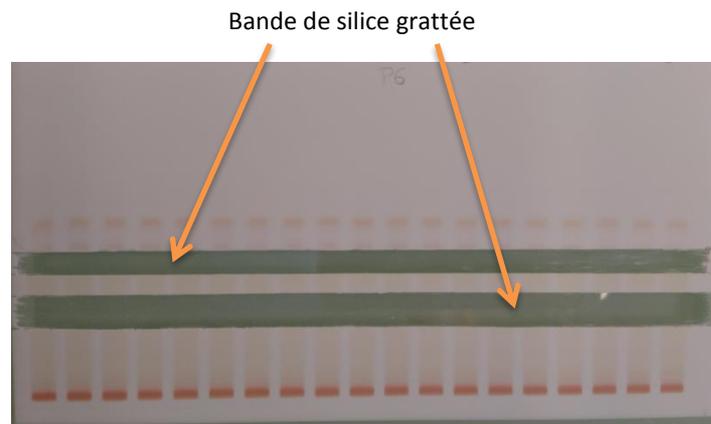
Photo bioautogramme P6
(64 µg EAG pour 100g de propolis brute)

-> 2 zones présentant potentiellement une activité biologique

➤ Quels sont les composés antifongiques?



Etape 1 : élution

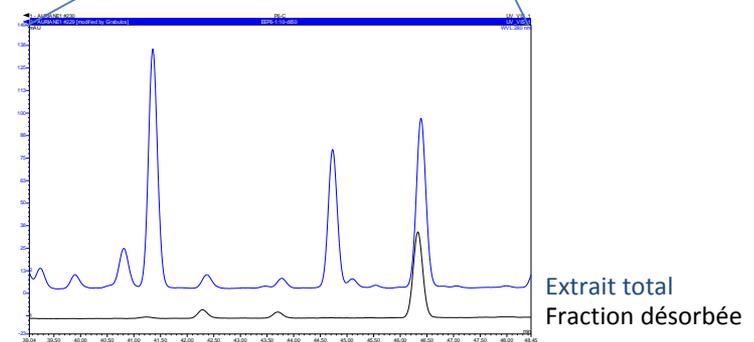
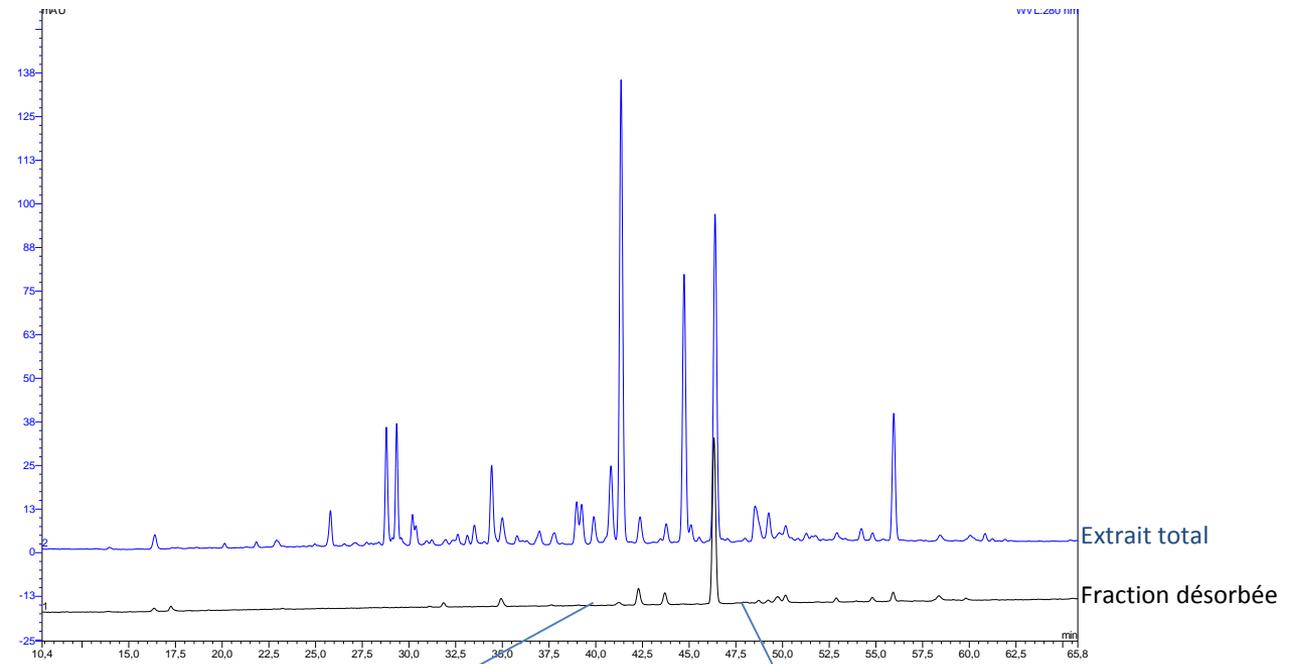
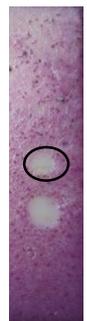


Etape 2 : grattage / désorption

La CCM bioautographique agar overlay

➤ Quels sont les composés biologiquement actifs?

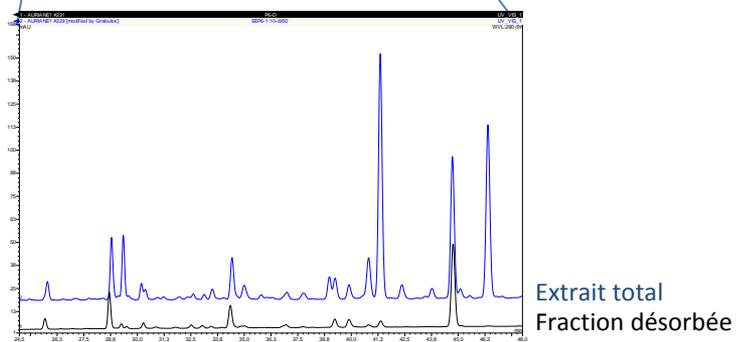
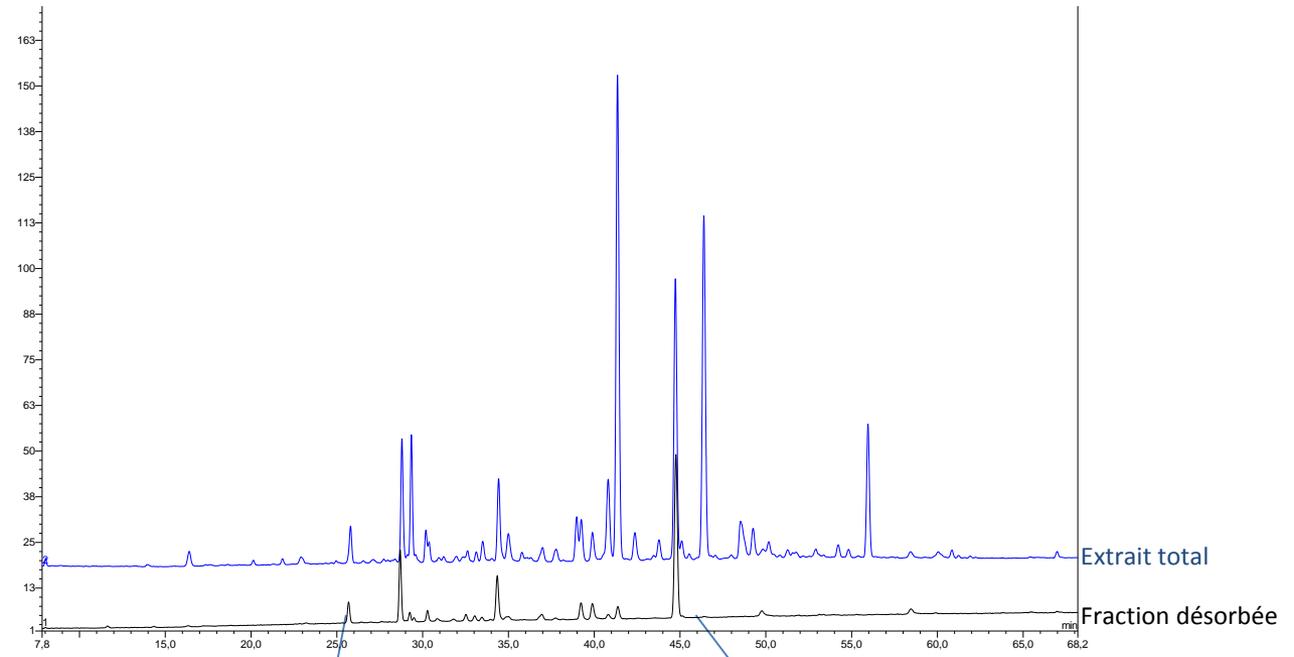
Etape 3 : tentative d'identification par HPLC



La CCM bioautographique agar overlay

➤ Quels sont les composés biologiquement actifs?

Etape 3 : tentative d'identification par HPLC



Mission à la Réunion (du 05-02-17 au 21-03-2017)

Essais *in vivo*

- **Rappel** : Dépôt de brevet (1^{er} trimestre 2017)
« Utilisation d'un extrait aqueux de propolis afin de traiter les fruits en post-récolte contre les maladies de conservation »

Intérêt de la société  Pollenergie

1^{er} marché visé : bananes

A suivre : fruits de la région Sud-Ouest (prunes)



- ↳ Mise au point d'un extrait aqueux de propolis (alcool < 0,5% en accord avec la constitution du dossier d'approbation de la propolis comme substance de base)

Mission à la Réunion (du 05-02-17 au 21-03-2017)

Essais *in vivo*

1- Mise au point du protocole de traitement des bananes par l'extrait aqueux de propolis (concentration en principes actifs, mode d'application)

2- Réalisation des essais sur bananes en traitement post-récolte

- Pourriture de couronne / anthracnose de blessure / anthracnose de quiescence

- Pulvérisation / trempage

- Extrait aqueux / Extrait éthanolique / Antifongique chimique / Témoin

3- Analyse sensorielle

Visuel / Goût



Planning prévisionnel



Fév-Mars 2017
Mission à la Réunion
(6 semaines) : essais sur bananes

Avril – Juin 2017
Rédaction du manuscrit

Septembre 2017
Soutenance

A close-up photograph of a bee on a yellow flower. The bee is positioned in the center, facing right, with its wings partially spread. The flower's stamens and petals are bright yellow and in sharp focus. A semi-transparent grey rectangular box is overlaid across the middle of the image, containing the text "Merci de votre attention" in a black, italicized serif font.

Merci de votre attention