

Travail de fin d'études en chimie et bio-industries Contribution à l'étude des sites d'action d'huiles essentielles dans le mycélium de *Phytophthora infestans* & décryptage de certains modes d'action cellulaires.

Auteur : Hick, Nathan

Promoteur(s) : Martini, Florian; Genva, Manon

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2025-2026

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/25107>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Contribution à l'étude des sites d'action d'huiles
essentielles dans le mycélium de *Phytophthora*
infestans & décryptage de certains modes d'action
cellulaires

HICK NATHAN

TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES.

ANNEE ACADEMIQUE 2025-2026

(CO)-PROMOTEUR(S): DR GENVA MANON, MARTINI FLORIAN.

Mention de copyright :

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Mention de responsabilité :

Le présent document n'engage que son auteur.

Mention sur l'utilisation de l'IA :

L'intelligence artificielle a été utilisée lors de ce travail comme :

- support à la rédaction des codes de traitement statistique sur le logiciel R, et
- support à la rédaction par exemple : correction orthographique et organisation des références bibliographiques.

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre(s) du personnel enseignant de GxABT

Contribution à l'étude des sites d'action d'huiles
essentielles dans le mycélium de *Phytophthora*
infestans & décryptage de certains modes d'action
cellulaires

HICK NATHAN

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES.**

ANNEE ACADEMIQUE 2025-2026

(CO)-PROMOTEUR(S): DR GENVA MANON, MARTINI FLORIAN.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement la professeure Marie-Laure Fauconnier, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail de fin d'études.

Je remercie également mes deux co-promoteurs, Florian Martini et Manon Genva pour leur accueil, leur accompagnement, leur patience et leurs précieux conseils tout au long de ce travail, ainsi que pour la relecture attentive de ce travail.

Un merci également à Clément Burgeon pour sa collaboration, sa disponibilité et ses remarques avisées tout au long de ce travail.

Ma reconnaissance va également à l'ensemble des doctorants du laboratoire, Aubin, Gaëlle, Jérémy, Leonel, Louise et Victoria pour leur aide, les échanges scientifiques enrichissants et l'ambiance de travail conviviale qu'ils ont contribué à instaurer.

Je remercie également les techniciens du laboratoire, Adrien, Franck, Maxime, Thomas et Virginie pour leur disponibilité, leur assistance technique et leur soutien tout au long de la réalisation de ce travail expérimental.

Enfin, je remercie chaleureusement ma famille, ainsi que mes ami(e)s pour leur présence, leurs encouragements et leur soutien moral durant mes études.

Résumé

Le mildiou de la pomme de terre, causé par *Phytophthora infestans*, demeure l'une des menaces phytosanitaires les plus dévastatrices à l'échelle mondiale, en raison de son fort impact économique et de l'émergence récurrente de résistances aux fongicides de synthèse. L'objectif de ce travail est de contribuer à une meilleure compréhension des modes et sites d'action d'huiles essentielles (HEs) aux propriétés anti-oomycètes sur *P. infestans*. Six HEs (origan, clou de girofle, cannelle de Chine, cannelle de Ceylan, bergamote et romarin) ont été caractérisées chimiquement par GC-MS² et évaluées *in vitro* pour leur activité anti-oomycète sur différents génotypes européens de *P. infestans*. Les HEs les plus actives ont ensuite fait l'objet d'analyses approfondies visant à décrypter leurs mécanismes d'action, notamment via des essais de conductimétrie visant à évaluer l'intégrité membranaire, de détection du stress oxydatif intracellulaire et de l'étude de la dynamique de pénétration de leurs composés majoritaires au travers des cellules.

Les résultats montrent que les HEs d'origan, de cannelle de Chine et de clou de girofle présentent une activité inhibitrice marquée, corrélée à la présence de leur composé majoritaire, des phénylpropanoïdes, tels que le carvacrol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde. Ces HEs induisent une augmentation rapide de la perméabilité membranaire, suggérant une désorganisation précoce de la membrane plasmique de *P. infestans*. Une production variable d'espèces réactives de l'oxygène est également observée, indiquant que le stress oxydatif constitue un mécanisme d'action complémentaire dépendant du chémotype de l'huile essentielle. Enfin, l'étude de la dynamique de pénétration révèle que la répartition des composés au sein des différents compartiments cellulaires est principalement déterminée par la nature de ces compartiments biologiques. Les trois composés quantifiés présentent une distribution globalement similaire, à l'exception d'une association préférentielle du carvacrol au niveau de la paroi cellulaire.

Dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité anti-oomycète des HEs repose sur une pression multicible impliquant des interactions rapides avec les structures cellulaires plutôt qu'une accumulation intracellulaire massive. Ce travail apporte ainsi de nouveaux éléments de compréhension sur les mécanismes d'action des HEs et renforce leur intérêt potentiel comme alternatives ou compléments aux stratégies de lutte conventionnelles contre le mildiou de la pomme de terre.

² GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

Abstract

Potato late blight, caused by *Phytophthora infestans*, remains one of the most devastating phytosanitary threats worldwide, due to its strong economic impact and the recurrent emergence of resistance to synthetic fungicides. The objective of this work is to contribute to a better understanding of the modes and sites of action of essential oils (EOs) with anti-oomycete properties against *P. infestans*. Six EOs (oregano, clove, Chinese cinnamon, Ceylon cinnamon, bergamot and rosemary) were chemically characterized by GC-MS and evaluated in vitro for their anti-oomycete activity against different European genotypes of *P. infestans*. The most active EOs were subsequently subjected to in-depth analyses aimed at elucidating their mechanisms of action, notably through conductimetry assays to assess membrane integrity, detection of intracellular oxidative stress, and the study of the penetration dynamics of their major compounds across cells.

The results show that oregano, Chinese cinnamon and clove EOs exhibit a marked inhibitory activity, correlated with the presence of their major compounds, phenylpropanoids such as carvacrol, eugenol and cinnamaldehyde. These EOs induce a rapid increase in membrane permeability, suggesting an early disorganization of the plasma membrane of *P. infestans*. A variable production of reactive oxygen species is also observed, indicating that oxidative stress constitutes a complementary mechanism of action depending on the chemotype of the essential oil. Finally, the study of penetration dynamics reveals that the distribution of compounds among the different cellular compartments is mainly determined by the nature of these biological compartments. The three quantified compounds display a globally similar distribution, except for a preferential association of carvacrol with the cell wall.

Taken together, these results suggest that the anti-oomycete activity of EOs relies on a multicellular-target pressure involving rapid interactions with cellular structures rather than a massive intracellular accumulation. This work thus provides new insights into the mechanisms of action of EOs and reinforces their potential interest as alternatives or complements to conventional control strategies against potato late blight.

TABLE DES MATIÈRES

1.	Objectifs.....	7
2.	Etat de l'art.....	7
2.1.	Contexte agronomique.....	7
2.2.	Biologie de <i>P. infestans</i>	8
2.2.1.	Taxonomie.....	8
2.2.2.	Cycle de vie.....	9
2.2.3.	Phase sexuée.....	9
2.2.4.	Phase asexuée.....	9
2.3.	Dissémination et survie.....	10
2.4.	Membrane et paroi des oomycètes.....	11
2.5.	Limites des méthodes actuelles de lutte contre <i>P. infestans</i>	12
2.6.	Huiles essentielles (HEs).....	13
2.7.	Composition des HEs sélectionnées.....	15
2.8.	Mode d'action des HEs sur <i>P. infestans</i>	17
2.8.1.	Désorganisation membranaire et stress osmotique.....	17
2.8.2.	Stress oxydatif.....	18
2.8.3.	Une pression multicible.....	18
3.	Matériel.....	19
3.1.	Matériel biologique.....	19
3.2.	Repiquage des souches.....	19
3.3.	Culture de biomasse.....	20
3.4.	Matériel chimique.....	21
4.	Méthode.....	21
4.1.	Analyse du profil chimique des HEs.....	21

4.2.	Caractérisation du potentiel anti-oomycète des HEs sur boîtes de Pétri	22
4.3.	Evaluation des fuites électrolytiques causées par HEs sur le mycélium <i>in vitro</i>	23
4.4.	Quantification du stress oxydatif causé par les HEs sur le mycélium <i>in vitro</i>	24
4.5.	Détermination de la dynamique de répartition des composés majoritaire des HEs sur le mycélium	25
5.	Résultats	27
5.1.	Caractérisation chimique des HEs par GC-MS	27
5.1.1.	Profil chimique de l'HE d'origan (<i>Origanum vulgare</i>)	27
5.1.2.	Profil chimique de l'HE de clou de girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>)	27
5.1.3.	Profil chimique de l'HE de cannelle de Chine (<i>Cinnamomum cassia</i>)	28
5.1.4.	Profil chimique de l'HE de cannelle de Ceylan (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	28
5.1.5.	Profil chimique de l'HE de bergamote (<i>Citrus bergamia</i>)	29
5.1.6.	Profil chimique de l'HE de romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	29
5.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (MIC) sur milieu solide	29
5.2.1.	Etude de l'activité anti-oomycète des HEs	30
5.2.2.	Etude de l'activité anti-oomycète des composés majoritaires	31
5.3.	Effet des HEs sur la conductivité membranaire de <i>P. infestans</i> EU-37	32
5.3.1.	Cinétique de conductimétrie de <i>P. infestans</i> traité avec l'HE d'origan	33
5.3.2.	Cinétique de conductimétrie de <i>P. infestans</i> traité avec l'HE de cannelle de Chine	34
5.3.3.	Cinétique de conductimétrie de <i>P. infestans</i> traité avec l'HE de clou de girofle	35
5.4.	Détection de la production de ROS par fluorescence (DCFH-DA)	36
5.4.1.	Effet des HEs de clou de girofle et de cannelle sur la production de ROS	36
5.4.2.	Effet de l'HE d'origan sur la production de ROS	37
5.5.	Etude de la dynamique de pénétration	38
5.5.1.	Validation analytique du protocole	38

5.5.2.	Dynamique de pénétration des HEs et répartition des composés majoritaires au sein des différents compartiments cellulaires de <i>P. infestans</i>	39
5.5.3.	Analyse statistique et reproductibilité	40
5.5.4.	Synthèse des résultats de la dynamique de pénétration des HEs dans le mycélium de <i>P. infestans</i>	42
6.	Discussion.....	42
6.1.	Caractérisation du profil chimique des HEs par GC-MS.....	42
6.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (MIC) sur milieu solide.....	44
6.2.1.	Activité anti-oomycètes des HEs et rôle des composés majoritaires	44
6.2.2.	Comparaison entre HEs et extraits enrichis.....	44
6.2.3.	Effet de l'enrichissement en composés majoritaires.....	45
6.2.4.	Effet fongicide ou fongistatique des mélanges testés	46
6.3.	Cinétique de conductimétrie.....	46
6.4.	Quantification du stress oxydatif causé par les HEs sur les (zoo)spores de <i>P. infestans</i>	48
6.5.	Dynamique de pénétration des composés majoritaires des HEs.....	50
6.5.1.	Répartition préférentielle aux structures périphériques	50
6.5.2.	Répartition des composés dominée par la nature du compartiment cellulaire	51
6.5.3.	Lien entre propriétés anti-oomycètes et les autres résultats expérimentaux	52
7.	Conclusion	53
8.	Perspectives	54
9.	Annexes	56
10.	Bibliographie	61

1. OBJECTIFS

L'objectif général de ce travail est de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'action anti-oomycètes des huiles essentielles (HEs) sur *Phytophthora infestans*, l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre. Plus spécifiquement, ce travail vise à identifier les HEs les plus actives sur le mycélium de *P. infestans* et à décrypter certains de leurs modes et sites d'action à l'échelle cellulaire.

Dans un premier temps, six HEs (origan, girofle, cannelle de Ceylan, cannelle de Chine, bergamote et romarin) ont été sélectionnées et évaluées pour leur activité antifongique. Les HEs les plus efficaces ont ensuite fait l'objet d'analyses approfondies visant à déterminer leurs cibles potentielles au sein du mycélium et les mécanismes par lesquels elles exercent leur effet inhibiteur.

2. ETAT DE L'ART

2.1. Contexte agronomique

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. 1753) a été domestiquée pour la première fois dans les Andes, en Amérique du Sud, il y a environ 8000 ans à la frontière de la Bolivie et du Pérou (Birch *et al.*, 2012). Appartenant à la famille des *Solanaceae*, elle est utilisée tant pour l'alimentation humaine que pour l'industrie. La pomme de terre est aujourd'hui cultivée dans plus de 150 pays à travers le globe, s'étendant sur plus de 20 millions d'hectares pour une production annuelle avoisinant les 300 millions de tonnes.

Depuis 1990, la production mondiale de pommes de terre a augmenté d'environ 20%, ce qui démontre la robustesse de ce tubercule face aux défis environnementaux et socio-économiques de notre époque (Jennings *et al.*, 2020). Plus d'un milliard de personnes consomment aujourd'hui des pommes de terre de manière régulière dans le monde, la Chine et l'Inde étant les principaux producteurs (Ojha *et al.*, 2025 ; International Potato Center, 2024). La pomme de terre se classe parmi les trois cultures vivrières majeures en termes de consommation humaine, après le riz et le blé (Birch *et al.*, 2012), et occupe le quatrième rang mondial en termes de volume de production après le maïs, le blé et le riz (Kennedy *et al.*, 2019).

Cette culture joue un rôle clé et central dans la sécurité alimentaire de nombreuses régions, particulièrement dans les pays en développement. Cette dernière est particulièrement riche en amidon (source d'énergie), fibres alimentaires, vitamine C, potassium et autres minéraux essentiels (Zaheer *et al.*, 2016). La pomme de terre est également populaire grâce à sa densité calorifique, son cycle végétatif court et son rendement élevé (Jennings *et al.*, 2020). En effet, en

comparant avec d'autres grandes cultures, son rendement surfacique est particulièrement efficace, jusqu'à sept fois supérieur à celui du blé (*Triticum aestivum*), ce qui la rend tout à fait adaptée aux contextes de raréfaction des ressources en eau et en terre arable (Jennings *et al.*, 2020 ; Beals., 2018).

Enfin, la pomme de terre trouve également des débouchés dans plusieurs secteurs non alimentaires notamment pour la production d'amidon. Cette production est destinée aux industries cosmétique, agroalimentaire, de bioplastiques et de l'alimentation animale. Cette diversité dans les usages à la fois agronomiques et industriels, confère à la pomme de terre un rôle clé à l'échelle mondiale (Hu *et al.*, 2025 ; Ojha *et al.*, 2025).

La culture de la pomme de terre est cependant confrontée à un très large spectre d'agents pathogènes (fongiques/pseudofongiques, bactériens et viraux). Parmi ces maladies induites par des pathogènes, le mildiou, causé par *P. infestans* demeure actuellement la maladie la plus dévastatrice. En effet, en termes de pertes (rendement et coûts de gestion), les estimations récentes situent l'impact économique global annuel causé par le mildiou de la pomme de terre entre 6,1 milliards d'euros et jusqu'à 10 milliards de dollars US (selon les contextes et les différentes méthodes d'estimation). Ces chiffres englobent autant les pertes de production que les coûts de protection chimique et confirment donc la place centrale de la gestion de cette maladie dans les stratégies phytosanitaires actuelles. (Fry, 2015 ; Nowicki *et al.*, 2012 ; Bubolz *et al.*, 2022 ; Liu *et al.*, 2022).

P. infestans possède également une capacité d'adaptation rapide due à ses mécanismes d'évolution de la virulence, de contournement induisant des résistances et de la diminution de sa sensibilité aux fongicides. Tous ces facteurs en font un pathogène réémergent malgré plus de 150 ans d'études et de lutte intensive. Les études récentes soulignent la plasticité évolutive de *P. infestans* et l'inefficacité croissante des stratégies classiques de contrôle chimique quand ces dernières ne sont pas ajustées continuellement (Fry, 2015 ; Leesutthiphonchai *et al.*, 2018 ; Ivanov *et al.*, 2021 ; Firester *et al.*, 2018).

2.2. Biologie de *P. infestans*

2.2.1. Taxonomie

Le genre *Phytophthora* est décrit pour la première fois par de Bary en 1876. Il regroupe actuellement aux alentours de 200 espèces officiellement reconnues. Le nombre estimé total pouvant atteindre 300–400 espèces en raison de la découverte de nombreuses espèces encore non formellement décrites (Brasier *et al.*, 2022 ; Abad *et al.*, 2023).

Sur le plan taxonomique, *P. infestans* appartient au phylum des Oomycota, classe des Oomycetes, ordre des Peronosporales, famille des *Peronosporaceae* (Abad *et al.*, 2023). Ce phylum fait lui partie du supergroupe des Straménophiles (ou Heterokonta), inclus dans le règne des Chromistes, une lignée distincte des vrais champignons (Fungi) malgré certaines convergences morphologiques (Beakes et Glockling, 2012).

2.2.2. Cycle de vie

Le cycle de vie de *P. infestans* comporte à la fois une phase asexuée et une phase sexuée, ces dernières adaptées à la colonisation et à la survie dans divers environnements (Judelson & Blanco, 2005 ; Fry, 2008). Contrairement aux vrais champignons, *P. infestans* est diploïde durant la majorité de son cycle végétatif (Kamoun *et al.*, 2015).

2.2.3. Phase sexuée

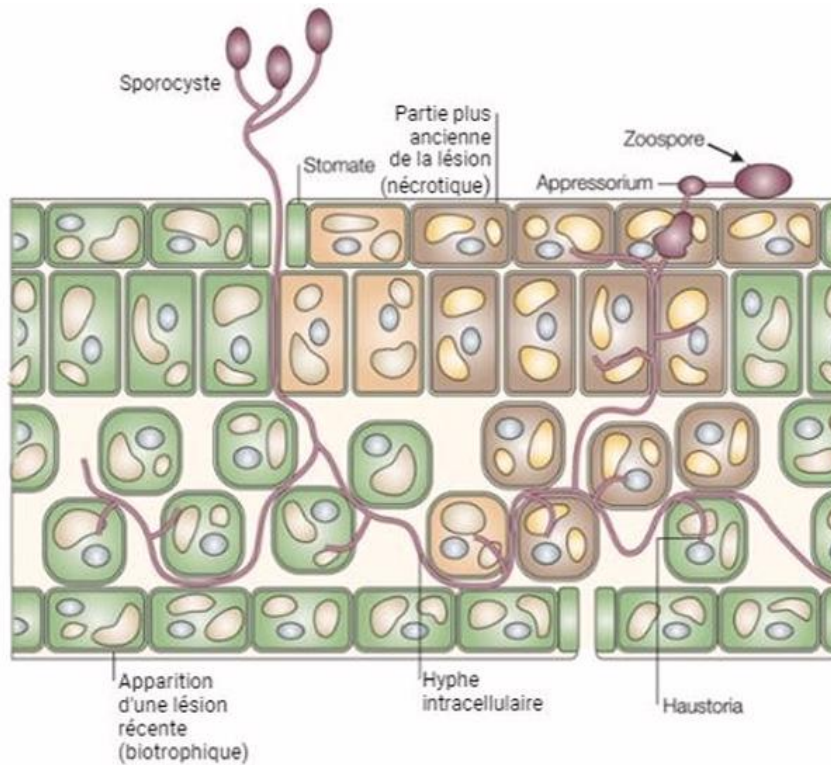
La reproduction sexuée est hétérothallique et nécessite la rencontre de deux types sexuels compatibles (désignés A1 et A2), permettant la formation des oogones et des anthéridies (Mazáková *et al.*, 2006). Leur fusion aboutit à la formation d'oospores, des spores sexuées à paroi épaisse capables de survivre aux conditions défavorables, telles que l'hiver ou la sécheresse. Elles représentent une source importante de variation génétique car elles résultent de la recombinaison des génomes des deux parents, ce qui peut favoriser l'émergence de nouvelles souches résistantes aux fongicides ou aptes à contourner les défenses des plantes (Gallegly & Hong, 2008 ; Pérez *et al.*, 2021).

2.2.4. Phase asexuée

La propagation rapide et efficace de l'agent du mildiou est principalement assurée grâce à la multiplication asexuée. À partir du mycélium infectant, des sporangiophores portent des sporocystes qui, selon les conditions environnementales, peuvent soit germer directement en produisant un tube germinatif, soit libérer des zoospores biflagellées (avantageux à basse température et forte humidité) (Judelson & Blanco, 2005 ; Lebreton *et al.*, 2019). Ces zoospores s'enkystent ensuite et forment un tube germinatif ainsi qu'un appressorium (Figure 1). Il s'agit là d'une structure spécialisée permettant la pénétration mécanique et enzymatique des tissus de l'hôte (Kwon *et al.*, 2021). Une fois sur la surface de l'hôte, le tube germinatif pénètre via l'appressorium et forme des haustoria intracellulaires (Figure 1). Ces derniers facilitent le transfert de nutriments et effectuent la délivrance d'effecteurs immunosuppresseurs (Whisson *et al.*, 2007 ; Boevink *et al.*, 2020). Le pathogène fait preuve d'hémibiotrophie et adopte deux phases qui se succèdent dans le temps. La phase biotrophe, évitant la mort cellulaire de la plante hôte, est suivie d'une phase nécrotrophe caractérisée par la destruction massive des tissus infectés

(Kamoun *et al.*, 2015). Bien que la multiplication asexuée via les zoospores permette une dispersion rapide et épidémique, la reproduction sexuée est essentielle pour la survie à long terme et l'évolution génétique de l'espèce (Gallegly & Hong, 2008 ; Pérez *et al.*, 2021).

Figure 1 : Infestation d'un hôte par *Phytophthora infestans* (Judelson 2005)



2.3. Dissémination et survie

Les sporocystes sont facilement disséminés par le vent et la pluie (Figure 2), permettant des épidémies rapides (Fry, 2008). Les oospores et fragments de mycélium contaminant les tubercules ou le sol servent de réservoirs d'inoculum entre les saisons de culture (Pérez *et al.*, 2021).

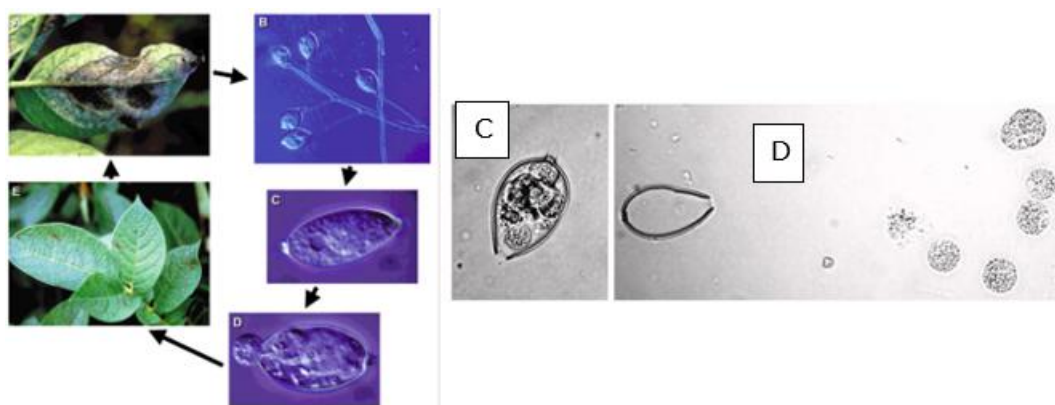


Figure 2 : Cycle de vie asexué de *P. infestans* : (A, B) Croissance des sporocystes depuis les tissus infectés. (C x2) libération des sporocystes dans l'eau ou l'atmosphère. (D x2) libération des zoospores. (E) germination sur l'hôte après enkystement (Fry., 2008).

2.4. Membrane et paroi des oomycètes

La paroi cellulaire des oomycètes, comme *P. infestans*, présente une composition et une organisation distinctes de celles des champignons véritables (Eumycètes) (Grenville-Briggs *et al.*, 2008 ; Latijnhouwers *et al.*, 2003). Alors que les champignons construisent leur paroi principalement avec de la chitine, celle des oomycètes est majoritairement constituée de cellulose (30–35 %) et d'autres β -glucanes (β -1,3 et β -1,6), avec des quantités très faibles, voire nulles, de chitine (Fawke *et al.*, 2015). Cette architecture contribue à la rigidité mécanique nécessaire à la formation d'appressoria et de structures infectieuses.

L'étude de ces structures pariétales repose sur plusieurs approches analytiques. Des techniques de microscopie électronique à balayage (SEM) et à transmission (TEM) ont permis de visualiser l'organisation lamellaire et la densité de la paroi (Judelson & Blanco, 2005). La microscopie confocale à balayage laser (CLSM), couplée à des colorants spécifiques tels que le Calcofluor White (qui possède une affinité à la cellulose et aux β -glucanes) ou la concanavine A-FITC (qui a une affinité pour les mannoprotéines), permet une observation tridimensionnelle *in situ* de la paroi cellulaire et de son intégrité lors de l'interaction avec des composés antifongiques (Bartnicki-García & Wang, 2013 ; Lebeau *et al.*, 2022). Enfin, des méthodes de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou de microscopie Raman sont utilisées pour caractériser la composition chimique globale et suivre les modifications structurales induites par des stress chimiques ou biologiques (Nanda *et al.*, 2019). Ces outils analytiques constituent ainsi une base essentielle pour l'étude de la cinétique de pénétration des composés bioactifs à travers la paroi des oomycètes.

Contrairement aux champignons, les oomycètes sont incapables de synthétiser des stérols *de novo* mais peuvent les assimiler depuis l'environnement ou l'hôte, notamment sous forme de cholestérol, de stigmasterol ou de β -sitostérol (Madoui *et al.*, 2009 ; Gaulin *et al.*, 2010). Ces stérols exogènes, intégrés dans la membrane cytoplasmique, jouent un rôle majeur dans la régulation de la fluidité membranaire, la perméabilité sélective et la signalisation cellulaire.

La bicouche lipidique de *P. infestans* est principalement composée de phospholipides tels que la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS), accompagnés de proportions moindres de glycolipides et de sphingolipides (Weete *et al.*, 2010 ; Grenville-Briggs *et al.*, 2013). Les acides gras associés à ces lipides sont majoritairement à chaîne moyenne à longue (C16 à C20), avec une forte proportion d'acides gras polyinsaturés, notamment l'acide linoléique (C18 :2) et l'acide arachidonique (C20 :4). Cette richesse en acides gras insaturés confère à la membrane une fluidité élevée, essentielle à la formation des structures

infectieuses (sporangies, zoospores) et à la réponse au stress oxydatif (Jiang *et al.*, 2005 ; Certik et Shimizu, 1999).

La faible proportion de glycolipides chez les oomycètes comparée aux champignons suggère un rôle plus restreint dans la reconnaissance hôte-pathogène. Bien que ce rôle soit plus restreint certains glycosphingolipides restent impliqués dans la différenciation des spores et la virulence chez *P. infestans* (Judelson, 2017 ; Raghukumar et Schloesser, 1990). (Madoui *et al.*, 2009 ; Lerouge *et al.*, 2020).

La composition lipidique des membranes d'oomycètes a pu être établie grâce aux avancées de la lipidomique, une approche analytique combinant l'extraction sélective des lipides et leur identification par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, GC-MS, ou plus récemment LC-MS/MS à haute résolution) (Horn & Chapman, 2014). Les lipides membranaires sont généralement extraits par des mélanges biphasés de solvants organiques tels que chloroforme-méthanol selon les protocoles classiques de Folch ou Bligh & Dyer, permettant la récupération conjointe des phospholipides, glycolipides et stérols (Bligh & Dyer, 1959 ; Folch *et al.*, 1957). Les profils ainsi obtenus fournissent une cartographie fine des classes lipidiques présentes, des longueurs de chaînes acyliques, du degré d'insaturation et de la présence de stérols exogènes, caractéristiques des membranes d'oomycètes (Jiang *et al.*, 2005 ; Weete *et al.*, 2010).

2.5. Limites des méthodes actuelles de lutte contre *P. infestans*

La gestion du mildiou de la pomme de terre repose historiquement sur un usage intensif de fongicides chimiques, généralement appliqués de manière préventive selon des programmes fixes (Cooke *et al.*, 2011 ; Haverkort *et al.*, 2016). Les principales familles utilisées incluent les phénylamides (ex. : metalaxyl), les carboxylic acid amides (CAA) tels que le mandipropamide, les inhibiteurs du site Qo de la quinone (strobilurines), ainsi que des fongicides de contact comme le fluazinam, souvent combinés à des produits multi-sites tels que le mancozèbe (Gisi *et al.*, 2011 ; Cooke *et al.*, 2012).

Cependant, l'efficacité de ces produits est aujourd'hui partiellement compromise (Tableau 1).

- Une résistance généralisée au metalaxyl et metalaxyl-M est documentée depuis les années 1980–1990 dans de nombreuses populations de *P. infestans* (Shattock, 2002 ; Gisi & Cohen, 1996).
- Des mutations ponctuelles, notamment dans le gène *PiCesA3*, confèrent une résistance aux CAA (mandipropamid), détectée dans des isolats nord-européens (génotype EU43_A1) (Schepers *et al.*, 2018 ; Hahn *et al.*, 2021).

- Plus récemment, des cas de résistance à l'oxathiapiprolin (un inhibiteur de la protéine OSBP impliquée dans le transport et la distribution des lipides), ont été rapportés, parfois associés à une résistance croisée avec d'autres CAA, sans coût de fitness apparent, facilitant la propagation de ces souches en conditions de champ (Miao *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2020).
- Enfin, une perte d'efficacité du fluazinam a été observée, notamment chez des génotypes dominants européens (EU_33_A2, EU_37_A2), compromettant le contrôle des zoospores (Cooke *et al.*, 2012 ; Schepers *et al.*, 2018).

Tableau 1 : Comparatif des différents fongicides utilisés dans la lutte contre *P. infestans*

Famille chimique	Molécule(s) active(s)	Mode d'action principal	Cible biologique inhibée	Résistance observée / génotype concerné
Phénylamides	Metalaxyl, Metalaxyl-M (mefenoxam)	Inhibition de la synthèse d'ARN ribosomal	ARN polymérase I	Résistance généralisée depuis 1980 (Shattock, 2002; Gisi & Cohen, 1996)
Carboxylic acid amides (CAA)	Mandipropamid, Dimethomorph, Iprovalicarb	Perturbation de la biosynthèse de la paroi cellulaire	Cellulose synthase	Mutations ponctuelles conférant résistance (génotype EU43_A1) (Hahn <i>et al.</i> , 2021)
Pyridinamine	Fluazinam	Inhibition du transfert d'électrons mitochondrial	Chaîne respiratoire	Perte d'efficacité chez EU_33_A2 et EU_37_A2 (Cooke <i>et al.</i> , 2012)
Benzamides	Zoxamide	Inhibition de la polymérisation des microtubules	β -tubuline	Peu de résistance signalée, efficacité réduite en conditions humides
Pyridinylmethyl-benzamide (Oxysterol-binding protein inhibitor)	Oxathiapiprolin	Inhibition de la biosynthèse des lipides et du trafic membranaire	Protéine OSBP (Oxysterol-binding protein)	Résistance émergente, parfois croisée avec CAA (Miao <i>et al.</i> , 2016; Liu <i>et al.</i> , 2020)

Cette évolution rapide de la résistance s'explique par la plasticité génétique de *P. infestans* et par son système de reproduction sexué et asexué, qui favorisent la recombinaison et l'émergence de variants résistants (Goodwin, 1997 ; Grünwald & Flier, 2005).

En parallèle, l'usage répété de ces produits entraîne des impacts environnementaux et sanitaires majeurs. Ils incluent l'accumulation de résidus dans les sols et les eaux, une toxicité sur les communautés aquatiques et microbiennes, ainsi qu'un coût économique élevé pour les producteurs (Haverkort *et al.*, 2016 ; Gisi *et al.*, 2011). Ces limites renforcent l'urgence de développer des stratégies de lutte alternatives et durables.

2.6. Huiles essentielles (HEs)

Les HEs sont définies légalement comme des produits d'origine végétale obtenus par distillation à la vapeur d'eau, par procédés mécaniques pour les zestes d'agrumes ou par distillation sèche, sans modification chimique intentionnelle, conformément à la norme ISO 9235. En agronomie, au regard des limites du recours aux fongicides classiques, les HEs suscitent un intérêt croissant. Elles sont des alternatives naturelles aux produits de synthèse combinant des propriétés

antifongiques, antibactériennes et insecticides en plus de représenter une alternative naturelle prometteuse face à *P. infestans* (Martini *et al.*, 2023).

Le chémotype d'une HE désigne la variation chimique dominante observée au sein d'une HE extraite à partir d'une même espèce végétale, c'est-à-dire le profil spécifique de molécules majoritaires présentes dans l'HE. Ainsi, deux plantes appartenant à la même espèce botanique peuvent produire des HEs différentes aux chémotypes distincts en raison de facteurs génétiques, environnementaux ou liés aux conditions de culture et de récolte. Le chémotype constitue donc un critère essentiel pour l'activité biologique d'une HE, car il détermine directement sa teneur en composés actifs et influence son efficacité antifongique, antibactérienne ou ses propriétés aromatiques. Par conséquent ce chémotype détermine aussi leur efficacité biologique contre des pathogènes comme *P. infestans* (Burt, 2004).

Parmi les familles botaniques de plantes à HE les plus étudiées à ce jour, les Lamiaceae (origan, thym), les Lauraceae (cannelle) mais aussi les Myrtaceae (clou de girofle) reviennent fréquemment comme sources d'HE présentant une activité antifongique contre *P. infestans* ou d'autres oomycètes (Martini *et al.*, 2023 ; Nazzaro *et al.*, 2017). Différents tests *in vitro* ont montré que certaines HE, notamment celles riches en phénols tels que le carvacrol, inhibent la croissance mycélienne ainsi que la germination des spores, avec des effets observés aussi bien en contact direct qu'en fumigation par l'activité inhibitrice de la phase volatile (Soylu *et al.*, 2006). Dans l'étude de Soyly *et al.* (2006), par exemple, l'HE d'origan riche en carvacrol a provoqué une inhibition significative de la croissance de *P. infestans* et a montré un effet par fumigation marqué à faibles concentrations.

La cannelle constitue un autre exemple d'HE fréquemment citée pour son efficacité anti-oomycètes. Son composé majoritaire extrait de son écorce ou de ses feuilles, le cinnamaldéhyde, perturbe l'intégrité membranaire et peut inhiber le développement de plusieurs agents phytopathogènes. Des travaux sur d'autres espèces proches de *P. infestans*, comme *Villosiclava virens*, ont mis en évidence une inhibition de la germination et de la croissance mycélienne par l'HE de cannelle, avec des valeurs d'IC₅₀ mesurées dans des gammes de quelques µg/mL (Zheng *et al.*, 2019). L'IC₅₀ (*median Inhibitory Concentration*) correspond à la concentration d'une substance nécessaire pour inhiber 50% de la croissance ou de l'activité biologique d'un organisme ou d'une enzyme cible. Elle constitue un indicateur de l'efficacité biologique d'un composé, permettant de comparer la puissance relative de différents agents antimicrobiens ou antifongiques : plus la valeur d'IC₅₀ est faible, plus le composé est considéré comme actif. Ces résultats confirment l'intérêt de cette HE, bien que les niveaux d'efficacité varient selon les pathogènes et les protocoles expérimentaux (Martini *et al.*, 2023).

Au-delà des essais *in vitro*, certains travaux menés *ex-vivo* ou en conditions semi-contrôlées rapportent une réduction significative de la sévérité du mildiou après application d'HE, notamment d'origan ou de cannelle. Cependant, ces bénéfices s'accompagnent parfois d'effets indésirables comme une phytotoxicité sur certaines variétés à haute concentration, ou une efficacité inconstante liée à la volatilité et à la stabilité chimique des HE (Martini *et al.*, 2023 ; Hyldgaard *et al.*, 2012). Ces observations soulignent à la fois le potentiel et les limites pratiques des HE, ainsi que la nécessité d'études complémentaires portant sur leur formulation et leur mode d'action pour envisager des applications agronomiques durables.

2.7. Composition des HEs sélectionnées

L'HE d'origan (*Origanum compactum* et *O. vulgare* ssp. *hirtum*) est caractérisée par une composition chimique dominée par le carvacrol (Tableau 2) ou le thymol. Ces composés sont reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes. Le carvacrol, en particulier, est étudié pour ses effets sur la perméabilité membranaire des cellules fongiques, tandis que le thymol est impliqué dans la perturbation de la membrane cellulaire et l'inhibition de la croissance des hyphes (Al-Mijalli *et al.*, 2022).

L'HE de cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) est caractérisée par une très forte proportion de cinnamaldéhyde (Tableau 2), lorsqu'elle est extraite de ses feuilles. Gill *et al.* (2006) ont montré que la distillation à la vapeur produit une HE contenant ~ 85 % de cinnamaldéhyde. De même, dans *Cinnamomum zeylanicum* (cannelle de Ceylan), l'huile essentielle issue de l'écorce peut contenir jusqu'à 97,7 % de cinnamaldéhyde (Ranasinghe *et al.*, 2023).

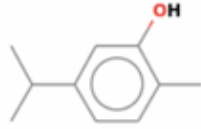
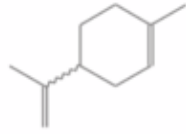
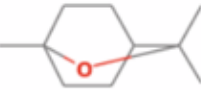
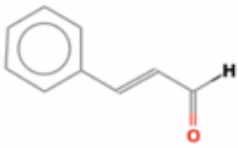
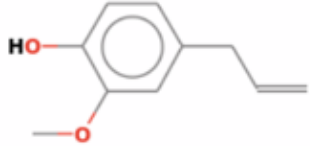
Concernant le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), son HE est classiquement dominée par l'eugénol (Tableau 2), souvent accompagné d'acétate d'eugényle et de β -caryophyllène (Demirci *et al.*, 2017).

L'HE de bergamote (*Citrus bergamia*) est principalement composée de limonène (Tableau 2) et de linalyl acétate, deux terpènes aux propriétés biologiques distinctes. Le limonène, un monoterpène hydrocarboné, est reconnu pour ses effets antimicrobiens, notamment contre *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* (Marotta *et al.*, 2016). Le linalyl acétate, un ester du linalol, présente des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, contribuant à l'activité antifongique globale de l'HE de bergamote (Barbarossa *et al.*, 2025).

L'HE de romarin (*Rosmarinus officinalis*) est dominée par l'eucalyptol (Tableau 2) et le α -pinène, deux monoterpènes aux effets antifongiques avérés. L'eucalyptol, également connu sous le nom 1,8-cinéole, et l' α -pinène ont montré une activité antimicrobienne significative contre *Candida*

albicans, inhibant la morphogénèse des hyphes ainsi que la formation de biofilm (Shahina *et al.*, 2022).

Tableau 2 : Composés majoritaires des différentes huiles essentielles (HEs) sélectionnées

Huile essentielle	Composé majoritaire	Fonction organique	Molécule
Origan (<i>Origanum vulgare</i> , <i>O. compactum</i>)	Carvacrol	Phénol	
Bergamote (<i>Citrus bergamia</i>)	Limonène	Alcène	
Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	1,8-Cinéole	Éther	
Cannelle de Chine (<i>Cinnamomum cassia</i>)	Cinnamaldéhyde	Aldéhyde	
Cannelle de Ceylan (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	Cinnamaldéhyde	Aldéhyde	
Girofle (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Eugénol	Phénol	

2.8. Mode d'action des HEs sur *P. infestans*

Les composés majoritaires présents dans certaines HE, tels que le carvacrol, le cinnamaldéhyde et l'eugénol, exercent une activité antifongique et anti-oomycète selon plusieurs mécanismes qui affectent directement la cellule de *P. infestans* (Figure 3).

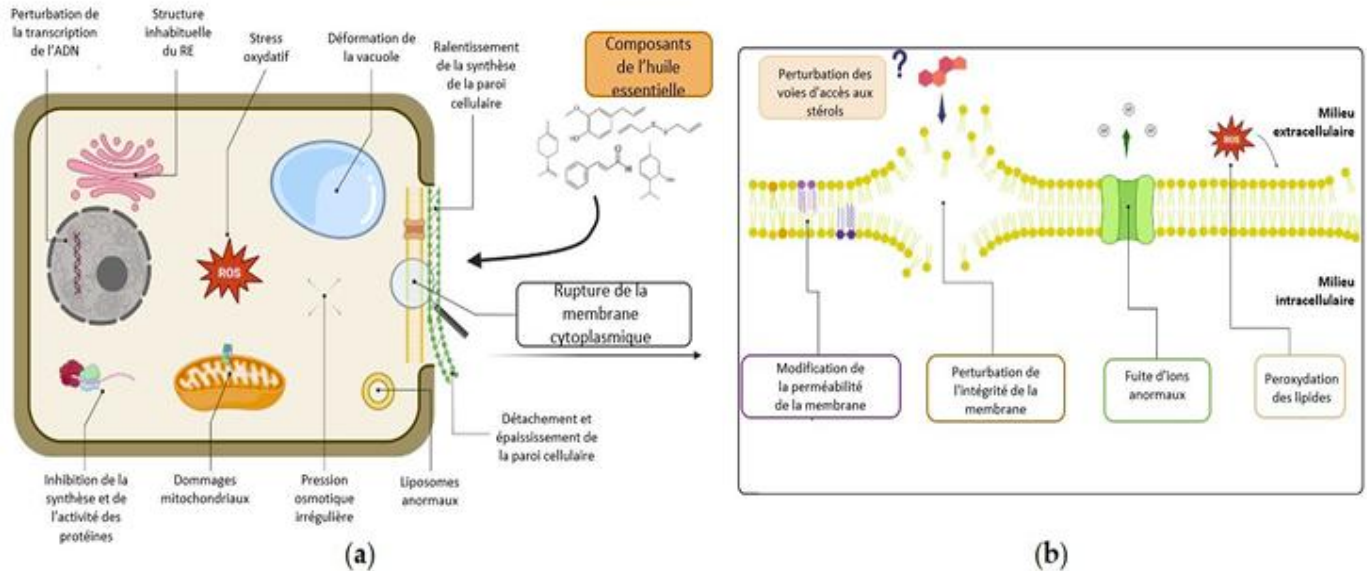


Figure 3 : Mécanismes possibles des HEs sur *P. infestans* de Martini *et al.*, 2023 : (a) impacts sur la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines, la pression osmotique, les dommages mitochondriaux, le réticulum endoplasmique, les liposomes, les vacuoles, la structure de la paroi cellulaire et l'intégrité de la membrane cytoplasmique. (b) Zoom sur les mécanismes de perturbation de la voie des stérols.

Ces mécanismes incluent principalement la désorganisation membranaire, l'induction d'un stress oxydatif, ainsi qu'une perturbation indirecte de l'équilibre osmotique (Martini *et al.*, 2022).

2.8.1. Désorganisation membranaire et stress osmotique

Les HEs peuvent dans certains cas exercer une action anti-oomycètes principalement en perturbant l'intégrité de la membrane plasmique. Cette altération membranaire résulte de l'interaction entre les composés lipophiles des HE, tels que le carvacrol, l'eugénol ou le cinnamaldéhyde qui se solubilisent facilement au sein des lipides membranaires. Ces interactions entraînent une désorganisation de la bicouche lipidique, augmentant la fluidité membranaire et compromettant les fonctions de la membrane plasmique. En conséquence, une fuite d'ions intracellulaires est observée, induisant un stress osmotique et perturbant l'homéostasie cellulaire (Martini *et al.*, 2023 ; Deweer *et al.*, 2023).

Des études ont démontré que l'exposition de *P. infestans* à des HE telles que celles de clou de girofle, de thym ou d'origan entraîne une inhibition significative de la croissance mycélienne, une réduction de la libération de zoospores et des déformations de hyphes visibles en microscopie électronique. Ces observations suggèrent une altération de la structure et de la fonction de la

membrane plasmique, entraînant une perte de l'intégrité cellulaire. La fuite d'ions, mesurée par des tests de conductivité, indique une perte de la capacité de la membrane à maintenir les gradients ioniques, ce qui est caractéristique d'un stress osmotique. L'impact des HEs sur la membrane plasmique de *P. infestans* est comparable à celui observé chez d'autres oomycètes et champignons pathogènes. Ceci renforce l'idée que la déstructuration membranaire est un mécanisme commun d'action des HEs qui compromet non seulement l'intégrité de la membrane plasmique mais affecte également la fonction des organites, contribuant ainsi à la mort cellulaire et à l'inhibition de la croissance ou du développement du pathogène (Deweere *et al.*, 2023 ; Tian *et al.*, 2024).

2.8.2. Stress oxydatif

En outre, les HE, notamment celles riches en monoterpènes phénoliques tels que le carvacrol, le thymol ou l'eugénol, induisent un stress oxydatif au sein des cellules de *P. infestans*. Ce stress résulte principalement de la génération accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), consécutive à la perturbation de l'intégrité des membranes plasmique et mitochondriale. La fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale favorise la formation de ces ROS qui s'accumulent lorsque les systèmes antioxydants endogènes sont dépassés (Martini *et al.*, 2023 ; Deweere *et al.*, 2023).

Les conséquences de cette accumulation sont multiples. La peroxydation des lipides membranaires fragilise la bicouche lipidique, augmentant la perméabilité et provoquant des fuites supplémentaires d'ions. Les protéines cellulaires, qu'elles soient membranaires ou cytoplasmiques, peuvent subir des modifications oxydatives qui altèrent leur fonction. De plus, des ROS comme le H_2O_2 peuvent atteindre le noyau et endommager l'ADN, entraînant des cassures ou des altérations des bases. Ces effets cumulés compromettent gravement la viabilité cellulaire et la capacité du pathogène à croître ou à se différencier. La cellule tente de réagir par l'activation de gènes de défense antioxydants, tels que ceux codant pour la superoxyde dismutase, les catalases ou les glutathions peroxydases mais cette réponse est souvent insuffisante face à des concentrations élevées d'HEs (Yap *et al.*, 2021).

Ainsi, le stress oxydatif constitue un mécanisme complémentaire aux perturbations membranaires et au stress osmotique, participant de manière synergique à l'activité antifongique des HEs sur *P. infestans*.

2.8.3. Une pression multicible

Outre la perturbation membranaire et le stress oxydatif, les HEs peuvent induire d'autres formes de stress sur *P. infestans* et des organismes proches. Parmi ceux-ci, on retrouve un stress

métabolique et énergétique, résultant de l'inhibition des enzymes clés de la respiration mitochondriale et de la production d'ATP, entraînant une croissance ralentie ou arrêtée (Di Pasqua *et al.*, 2007 ; Yap *et al.*, 2021). Les HE peuvent également perturber la biosynthèse et l'intégrité de la paroi cellulaire, fragilisant la structure et accentuant la vulnérabilité osmotique et mécanique (Judelson, 2017 ; Soylu *et al.*, 2006). De plus, des altérations des voies de signalisation intracellulaires ont été observées, affectant la différenciation des spores et la formation des structures infectieuses, ce qui réduit la virulence du pathogène (Judelson, 2017 ; Deweer *et al.*, 2023). Enfin, certaines HE induisent un stress transcriptionnel et adaptatif en activant l'expression de gènes de défense et des protéines chaperonnes (qui reflètent une réponse cellulaire aux conditions défavorables) (Yap *et al.*, 2021 ; Nazzaro *et al.*, 2013). L'ensemble de ces effets combinés souligne la capacité des HE à exercer une pression multicible sur *P. infestans*, limitant la probabilité de résistance spécifique.

3. MATÉRIEL

3.1. Matériel biologique

Trois génotypes européens de *Phytophthora infestans* (Tableau 3) ont été utilisés pour ce travail. Les différentes souches utilisées ont été fournies par le Centre Wallon de Recherche Agronomique (CRA-W). Ces souches ont été prélevées sur des tas de pommes de terre puis transférées sur un milieu petits pois gélosé et conservées à 18 °C.

Tableau 3 : Description de l'origine du matériel biologique utilisé

Souche	Dates de récolte	Support	Lieu
EU_13_A2	juil-21	Tas de déchets de pommes de terre	Cortil
EU_36_A2	juin-24	Tas d'écart de triage (Fontane)	Bomal
EU_37_A2	juin-20	Culture de pommes de terre (Fontane)	Leuze

3.2. Repiquage des souches

Afin d'assurer une production régulière de biomasse mycélienne, les souches de *P. infestans* ont été repiquées périodiquement. Un fragment issu d'une colonie en phase de croissance active a été transféré de manière stérile sur un milieu de culture V8-agar frais. Ce milieu est constitué de 15 g·L⁻¹ d'agar, 2 g·L⁻¹ de carbonate de calcium (CaCO₃), 0,0496 g·L⁻¹ de β-sitostérol, et d'un mélange comprenant 1/5 (v/v) de jus de tomate dilué dans de l'eau distillée.

Le milieu ainsi préparé a été utilisé de manière routinière pour la culture sur boîtes de Petri (BdP). Chaque boîte, contenant environ 15 mL de V8-agar stérilisé par autoclavage, a été ensemencée avec un fragment d'inoculum d'environ 0,5 cm², prélevé sur une culture âgée d'environ deux

semaines. Les cultures ont ensuite été incubées à 18°C, dans l'obscurité, pendant deux à trois semaines, ou jusqu'à leur utilisation dans les manipulations expérimentales impliquant *P. infestans*.

Toutes les manipulations ont été effectuées sous hotte à flux laminaire afin de garantir des conditions stériles. Les boîtes de Petri ont systématiquement été scellées avec du parafilm pour prévenir toute contamination. L'opération de repiquage a été répétée régulièrement afin de maintenir un stock constant de biomasse mycélienne nécessaire aux expérimentations ultérieures.

3.3. Culture de biomasse

Pour la production de biomasse destinée aux expérimentations, des colonies de *Phytophthora infestans* en fin de phase de croissance active, âgées de deux à trois semaines, ont été utilisées. Les cultures ont été humidifiées avec de l'eau stérile puis la surface mycélienne a été délicatement raclée à l'aide du dos d'un scalpel stérile afin de prélever les hyphes tout en les préservant intactes.

L'inoculum mycélien ainsi obtenu a ensuite été transféré dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL d'un milieu liquide préparé à partir du surnageant décanté d'une solution de culture analogue au V8, enrichie en glucose et peptone. Ce milieu présentait la composition suivante : 5,87 g·L⁻¹ de peptone, 12,33 g·L⁻¹ de glucose, 1,67 g·L⁻¹ de CaCO₃, 41 mg·L⁻¹ de β-sitostérol, et ¼ (v/v) de jus de tomate dilué dans de l'eau distillée. Les erlenmeyers ont ensuite été fermés à l'aide d'un bouchon en ouate (Figure 4), protégés de la lumière par un enveloppement en papier aluminium, puis placés sur un agitateur orbital (GFL 3020 Platform Shaker) à 100 tr·min⁻¹ et maintenus à 20°C pendant une durée de dix jours.



Figure 4 : Photo de deux cultures de *P. infestans* (génotype EU-37).

3.4. Matériel chimique

Les HEs sélectionnées pour cette étude (Tableau 4) sont celles d'origan (*Origanum vulgare*), clou de girofle (*Syzygium aromaticum*), cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*), cannelle de Ceylan - (*Cinnamomum zeylanicum*), bergamote (*Citrus bergamia*) et romarin (*Rosmarinus officinalis*). Elles proviennent toutes de l'agriculture biologiques et sont certifiées selon le label Ecocert FR-BIO-01.

Tableau 4 : Description des différentes HEs utilisées

Huile essentielle	Nom latin	Nom vernaculaire	Organe extrait	Type d'extraction
Origan	<i>Origanum vulgare</i>	Origan	Feuilles	Distillation
Clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	Clou de girofle	Boutons floraux séchés	Distillation
Cannelle de Chine	<i>Cinnamomum cassia</i>	Cannelle de Chine	Feuilles	Distillation
Cannelle de Ceylan	<i>Cinnamomum verum</i>	Cannelle de Ceylan	Écorce	Distillation
Bergamote	<i>Citrus aurantium</i> ssp. <i>bergamia</i>	Bergamote	Écorce du fruit	Pressage à froid
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin	Feuilles	Distillation

Achetées auprès de la société Aroma-Zone, elles ont été obtenues par distillation complète à la vapeur d'eau, à l'exception de la bergamote, extraite par expression à froid. Ces HEs répondent aux standards pharmaceutiques en étant 100 % pures et naturelles.

4. MÉTHODE

4.1. Analyse du profil chimique des HEs

L'analyse du profil chimique des HEs a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), à l'aide d'un système Agilent Technologies 7890A GC relié à un spectromètre de masse Agilent 5975C. La séparation des analytes a été effectuée sur une colonne capillaire VF-WAXms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm d'épaisseur de film).

Les échantillons ont été injectés en mode splitless (volume d'injection : 2 μL) sous une pression de 19,028 psi, à une température de 200°C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, avec un débit de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et une vitesse linéaire de 39,723 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

Le programme de température a débuté à 40°C (maintien 2 min) puis a augmenté à un taux de 5°C·min⁻¹ jusqu'à 260°C, température maintenue pendant 5 minutes, pour une durée totale d'analyse de 51 minutes. La détection par spectrométrie de masse a été opérée dans une plage de m/z de 35 à 400.

L'identification des composés a reposé sur le calcul des indices de rétention (RI) de chaque molécule, établis selon la méthode de Kovats à partir de l'élution d'une série de n-alcane (C₁₁-C₃₀) analysés dans les mêmes conditions chromatographiques. Les valeurs de RI obtenues ont été comparées à celles de la base de données NIST WebBook, et l'erreur relative associée a été indiquée. Les composés ont été identifiés jusqu'à ce qu'il ne reste au maximum que 3 % de composés non-identifiés sur la dernière ligne des tableaux. Enfin, l'identification des composés a été confirmée par le facteur de correspondance spectrale ("match factor"), retenu uniquement lorsque celui-ci était supérieur à 85 %. Les identifications complètes sont disponibles dans les annexes 1 à 6.

4.2. Caractérisation du potentiel anti-oomycète des HEs sur boîtes de Pétri

Le milieu V8-agar (V8-A) a été préparé comme détaillé au point 3.2 (ci-dessus). Un volume de 15 mL de ce mélange a été transféré dans des tubes en verre, hermétiquement scellés, puis stérilisés par autoclavage. Les milieux ont ensuite été maintenus en surfusion à 55°C jusqu'à leur utilisation.

Les HEs ont été préalablement émulsionnées dans un mélange eau et Tween 80 (en proportion 1:4, v/v par rapport à l'HE) afin de faciliter leur dispersion homogène dans le milieu. Ces émulsions ont ensuite été diluées afin d'obtenir les différentes concentrations souhaitées. Après homogénéisation, les milieux ont été amendés avec les concentrations souhaitées, en maintenant un volume constant de 300 μL pour chaque condition expérimentale. Les mélanges ont ensuite été réhomogénéisés puis versés dans des boîtes de Petri (BdP) stériles. Des contrôles négatifs et des témoins Tween 80 à 0,05 % (v/v) ont également été préparés (selon le même procédé), afin de s'assurer que les effets observés étaient attribuables aux HEs et non à l'agent émulsifiant.

Chaque milieu ainsi préparé a été ensemencé au centre à l'aide d'un disque d'inoculum mycélien de 0,5 cm de diamètre, prélevé sur une culture âgée de 14 jours. Toutes les modalités de concentration ont été inoculées à partir de la même boîte mère afin d'assurer l'uniformité des conditions initiales. Les boîtes de Petri ont ensuite été scellées pour éviter toute contamination ou

évaporation des composés organiques volatils (COVs). Les cultures ont été incubées à 18°C, dans l'obscurité, et la croissance radiale du mycélium a été mesurée 7 jours après inoculation afin d'évaluer la concentration minimum inhibitrice (MIC) au-delà de laquelle l'oomycète ne se développe plus.

4.3. Evaluation des fuites électrolytiques causées par HEs sur le mycélium *in vitro*

Pour ces essais, le protocole expérimental a été adapté d'après la méthode décrite par Zhang *et al.* (2016) dans le but d'évaluer l'effet des trois HEs les plus bioactives sur l'intégrité de la membrane cytoplasmique de *P. infestans*. La sélection de ces HEs repose sur les résultats obtenus lors des tests préliminaires en boîte de Pétri. Plusieurs contrôles ont été inclus dans le dispositif expérimental : un traitement au Triton X-100 (détergent non ionique) à des concentrations équivalentes à celles des HEs testées (témoin +), ainsi qu'un témoin non traité (témoin -). Le Triton X-100 est utilisé comme témoin positif car il provoque une perte complète de l'intégrité membranaire, produisant un signal de conductivité maximal.

Après culture, le milieu contenant la biomasse a été filtré sous Büchner, permettant la récupération du mycélium frais. Celui-ci a été rincé à l'eau non-distillée stérile pour éviter les stress osmotiques. Une quantité de 1,5 g de biomasse fraîche a ensuite été remise en suspension dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 15 mL d'une émulsion d'HE préparée à différentes concentrations (0,2 ; 1 ; 2 ; 5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$).

La conductivité électrique du milieu (en $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) a été mesurée à l'aide d'un conductimètre portable (TDS-/°C mètre CO 3000 H, pHenomenal®) après des temps d'exposition de 0, 20, 40, 60, 120, 180 minutes et 24h. À l'issue des 180 minutes, la biomasse a été congelée durant 24h. La congélation provoque la formation de cristaux de glace qui entraîne la perforation des membranes et l'augmentation de leur perméabilité lors de la décongélation. Une fois les 24h écoulées, le Falcon est passé sous vortex après décongélation. Ceci favorise la libération complète des constituants intracellulaires dans le milieu extracellulaire, permettant ainsi d'obtenir la valeur maximale de conductivité pour chaque échantillon.

Les résultats sont finalement exprimés en conductivité électrique relative, selon le calcul ci-dessous :

$$\text{Conductivité électrique relative} = \frac{t - t_i}{t_{\max}}$$

t : Conductivité du milieu de culture traitées avec mycélium

t_i : Conductivité milieu de culture traitées sans mycélium

t_{max} : conductivité maximum après décongélation

4.4. Quantification du stress oxydatif causé par les HEs sur le mycélium *in vitro*

La détection intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène a été réalisée à l'aide de la sonde fluorescente DCFH-DA³. Celle-ci pénètre passivement dans les cellules, où elle est déacétylée par des estérases intracellulaires en DCFH⁴ non fluorescent. En présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), le DCFH est oxydé en DCF⁵ fluorescent dont l'intensité est proportionnelle au niveau de ROS intracellulaires.

Une solution mère a été préparée en dissolvant 25 mg de DCFH-DA ($487,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) dans 1 mL de DMSO, correspondant à une concentration finale de 51,3 mM. Cette solution concentrée a ensuite été diluée dans du milieu glucose-peptone pour obtenir une concentration de travail de 10 μM , en veillant à maintenir un rapport élevé milieu/DMSO ($\approx 5000 :1$) afin de limiter au maximum l'exposition des spores au solvant. L'ensemble des étapes de préparation impliquant la sonde fluorescente a été effectué à l'abri de la lumière pour éviter toute oxydation prématurée.

Les spores de *P. infestans* ont été récoltées depuis les cultures sporulantes puis rassemblées dans un tube conique. Une aliquote a été prélevée pour la quantification au moyen d'une cellule de Malassez. Le comptage a révélé la présence de quinze spores dans dix carrés, soit une concentration estimée à $1,5 \times 10^4 \text{ spores}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cette suspension de spores a ensuite été centrifugée à 800 g pendant une minute. Après élimination du surnageant, le culot a été resuspendu dans un volume équivalent de milieu glucose-peptone supplémenté en DCFH-DA à 10 μM . Les spores ont été incubées pendant une heure à 23°C dans l'obscurité, de manière à permettre l'entrée du précurseur et son hydrolyse intracellulaire en DCFH non fluorescent.

À l'issue de l'incubation, les spores ont été rincées à trois reprises afin d'éliminer le colorant extracellulaire résiduel. Chaque rinçage consistait en une centrifugation à 800 g pendant une minute suivie du remplacement du surnageant par du milieu glucose-peptone dépourvu de DCFH-DA, dans un volume identique à celui retiré. Ce protocole de lavage permettait de garantir que le signal mesuré reflétait bien l'oxydation intracellulaire du colorant.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées dans des plaques 96 puits de type "chimney black", adaptées aux lectures cinétiques à fluorescence. Pour chaque condition, un volume final de 200 μL par puit a été préparé. Les traitements ont été déposés sous forme de 20 μL de solutions,

³ DCFH-DA : 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate

⁴ DCFH : 2',7'-dichlorodihydrofluorescein

⁵ DCF : 2',7'-dichlorofluorescein

immédiatement après l'ajout de 180 µL de suspension sporale ajustée pour atteindre une concentration finale d'environ $1,5 \times 10^4$ spores·mL⁻¹.

La cinétique de production de ROS a été suivie au moyen d'un lecteur de microplaques multimode à absorbance « Tecan - Spark Cyto ». Les mesures ont été effectuées toutes les cinq minutes pendant une durée totale de quatre heures, sous contrôle de température à 23°C. La fluorescence du DCF oxydé a été enregistrée en utilisant une longueur d'excitation de 485 nm et une longueur d'émission de 530 nm, avec un gain fixé à 65, déterminé préalablement. La plaque a été systématiquement protégée à l'aide d'un film afin de limiter l'évaporation et la dispersion des composés volatils, notamment du TBHP⁶, tout en conservant une lecture fiable malgré l'atténuation mineure de la transmission lumineuse.

Lors de cette expérimentation, plusieurs modalités ont été évaluées afin de caractériser l'impact des traitements sur la production intracellulaire de ROS. Un contrôle positif a été intégré, chacun basé sur l'ajout de TBHP, permettant de vérifier la sensibilité du système et la capacité des spores à générer un signal oxydatif détectable. Un contrôle négatif, constitué de spores maintenues en milieu glucose-peptone sans ajout de traitements, a servi de référence de base pour quantifier l'augmentation relative de fluorescence. Chaque condition expérimentale a été réalisée en trois réplicats. Enfin, les trois HEs présentant l'activité anti-oomycète la plus marquée lors des expérimentations antérieures (l'origan, la cannelle de Chine et le clou de girofle) ont été testées. Pour chacune d'elles, les concentrations utilisées correspondaient aux MIC déterminées préalablement, de manière à standardiser l'exposition et à comparer spécifiquement leur capacité à induire ou non une réponse oxydative chez *P. infestans*.

4.5. Détermination de la dynamique de répartition des composés majoritaire des HEs sur le mycélium

La méthode utilisée pour évaluer la pénétration des composés majoritaires des HEs dans le mycélium de *P. infestans* a été inspirée du protocole développé par Lichiheb *et al.* (2015) et des travaux effectués par Charline Dessilly lors de son mémoire (2024). Ce protocole a été modifié et optimisé pour être applicable à la biomasse d'oomycètes (comme *P. infestans*) puis validé analytiquement au travers de plusieurs expérimentations (voir 5.4.1. ci-dessous) afin d'évaluer la pertinence de ses solvants et de ses méthodes d'extraction.

Le mycélium est successivement exposé à trois solvants de polarités décroissantes afin d'atteindre progressivement les différentes barrières biologiques de *P. infestans* : la paroi, la membrane

⁶ TBHP : *tert-butyl hydroperoxide*.

plasmique, le cytoplasme. Cette exposition aux différents solvants a pour objectif d'en extraire les composés issus des HEs : adsorbés en surface, associés aux constituants pariétaux, intégrés dans la membrane ou internalisés au sein du cytoplasme.

Les solvants utilisés sont : de l'eau (rinçage de la paroi externe du mycélium), de l'isopropanol (extraction des composés pariétaux), de l'hexane (extraction des composés lipidiques de la membrane), de l'hexane après broyage à l'Ultra-Turrax (extraction des composés ayant pénétré jusqu'au cytoplasme).

Un gramme de biomasse fraîche provenant des cultures liquides est pesé puis transféré dans les tubes en verre contenant 5 ml des émulsions d'HEs préparées. Des témoins non traités sont préparés en parallèle. L'ensemble est incubé durant une heure à 18°C. Après une heure, les tubes sont centrifugés (4000 rpm, 15 min, Thermo Electron Corporation) afin de séparer le mycélium de la phase liquide. La phase surnageante (émulsion résiduelle, fraction 1) est extraite à l'aide de 5mL d'hexane. Après élimination de la phase liquide, le mycélium est successivement mis en contact avec :

1. 5 mL d'eau distillée – *fraction 2*
2. 5 mL d'isopropanol – *fraction 3*
3. 5 mL d'hexane – *fraction 4*
4. 5 mL d'hexane + broyage Ultra-Turrax (IKA, 24 000 rpm) – *fraction 5*

Avant chaque mise en contact (émulsion, témoins, solvants), un vortex est utilisé afin d'assurer une homogénéisation optimale. Chaque fraction est ensuite centrifugée (4000 rpm, 10 min) pour séparer le surnageant du mycélium.

Pour la fraction 2, une extraction liquide-liquide similaire à celle de la fraction 1 est réalisée afin d'isoler les composés présents dans l'eau. Pour les fractions 3, 4 et 5, le surnageant est récupéré puis filtré à travers un entonnoir contenant du sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer l'humidité résiduelle. Pour la fraction 5, une filtration supplémentaire sur membrane 0,22 µm (sous seringue) est effectuée avant transfert en vial pour injection GC-MS.

L'analyse des fractions extraites a été réalisée par GC-MS en utilisant exactement les mêmes conditions instrumentales que celles employées pour l'analyse du profil chimique des HEs.

Pour l'analyse des fractions, un mode de détection supplémentaire a été ajouté : en complément du mode Scan, un mode SIM (Selected Ion Monitoring) ciblant les ions caractéristiques des composés majoritaires propres à chaque HE a été appliqué (Annexe 9). Les composés majoritaires de chaque HE ont ainsi pu être quantifiés dans chaque différente fraction grâce aux courbes de

calibrage externes réalisées au préalable (Annexe 8) pour chacun des composés majoritaires dans chacun des solvants.

5. RÉSULTATS

5.1. Caractérisation chimique des HEs par GC-MS

La composition chimique des HEs a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Le pourcentage relatif de chacun des composés a été calculé à partir des aires normalisées (%) des chromatogrammes. L'identification des composés repose sur la comparaison des spectres de masse avec les bibliothèques de référence ainsi que sur la concordance des indices de rétention (RI) expérimentaux avec les valeurs rapportées dans la littérature. Les analyses ont été réalisées sur trois lots indépendants (n = 3).

Les composés majoritaires de chaque HE sont présentés ci-dessous, leur profil chimique complet étant répertoriés aux Annexes 1 à 6.

5.1.1. Profil chimique de l'HE d'origan (*Origanum vulgare*)

La composition de l'HE d'origan (Tableau 5, Annexe 4) est dominée par des composés phénoliques, le carvacrol représentant 50,7 % de la composition totale de l'HE. D'autres composés retrouvés en proportions abondantes sont également détectés parmi lesquels le p-cymène ($\approx 10,6$ %), le γ -terpinène ($\approx 8,1$ %), le thymol ($\approx 7,1$ %) et le β -caryophyllène ($\approx 6,8$ %). Des alcools monoterpéniques, tels que le linalol et le terpinèn-4-ol, sont également détectés à des proportions plus faibles (Annexe 4).

Tableau 5 : Composés majoritaires de l'HE d'origan (*Origanum vulgare*) analysés en GCMS (n=3).

Composé	CAS	% relatif	σ (%)	Fonction organique
Carvacrol	499-75-2	50,7	1,1	Phénol
p-Cymène	99-87-6	10,6	0,2	Hydrocarbure aromatique
γ -Terpinène	99-85-4	8,1	0,0	Hydrocarbure (alcène)
Thymol	89-83-8	7,1	0,1	Phénol

5.1.2. Profil chimique de l'HE de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*)

La composition de l'HE de clou de girofle (Tableau 6, Annexe 2) est très majoritairement composée de phénylpropanoïdes. L'eugénol constitue le composé principal de cette HE en représentant 63,0 % de la composition totale. L'acétate d'eugényle est également présent en proportion importante ($\approx 24,5$ %), tandis que le β -caryophyllène représente environ 7,9 % de la composition de l'HE.

Tableau 6 : Composés majoritaires de l'HE de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) analysés en GCMS (n=3).

Composé	CAS	% relatif	σ (%)	Fonction organique
Eugénol	97-53-0	63,1	0,7	Phénol
Acétate d'eugényle	93-28-7	24,5	0,1	Ester
β -Caryophyllène	87-44-5	7,9	0,1	Hydrocarbure (alcène)
Humulène	6753-98-6	2,1	0,5	Hydrocarbure (alcène)

5.1.3. Profil chimique de l'HE de cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*)

La composition de l'HE de cannelle de Chine (Tableau 7, Annexe 1) est caractérisée par une très forte proportion en phénylpropanoïdes. Le composé majoritaire est le (*E*)-cinnamaldéhyde, représentant environ 67,8 % de la composition totale. Des proportions plus faibles d'autres aldéhydes aromatiques, tels que le méthoxy-cinnamaldéhyde ainsi que de l'acétate de cinnamyle et du benzaldéhyde, sont également détectées.

Tableau 7 : Composés majoritaires de l'HE de cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) analysés en GCMS (n=3).

Composé	CAS	% relatif	σ (%)	Fonction organique
(<i>E</i>)-Cinnamaldéhyde	104-55-2	67,8	1,0	Aldéhyde
Méthoxy-cinnamaldéhyde	1504-74-1	14,9	1,3	Aldéhyde
Acétate de cinnamyle	103-54-8	5,4	0,3	Ester
Benzaldéhyde	100-52-7	3,2	0,3	Aldéhyde

5.1.4. Profil chimique de l'HE de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*)

En comparaison avec la cannelle de Chine caractérisée précédemment, l'HE de cannelle de Ceylan présente une composition plus diversifiée (Tableau 8, Annexe 5). Bien que le (*E*)-cinnamaldéhyde demeure bel et bien le composé majoritaire, sa proportion relative est inférieure à celle observée dans la cannelle de Chine (67%-53%). D'autres composés tels que le linalol, le β -caryophyllène et l'eugénol, contribuent de manière plus significative au chémotype global de cette plante.

Tableau 8 : Composés majoritaires de l'HE de cannelle de Ceylan (*Cinnamomum zeylanicum*) analysés en GCMS (n=3).

Composé	CAS	% relatif	σ (%)	Fonction organique
(<i>E</i>)-Cinnamaldéhyde	104-55-2	53,6	1,7	Aldéhyde
Linalol	78-70-6	7,8	0,1	Alcool
β -Caryophyllène	87-44-5	4,9	0,0	Hydrocarbure (alcène)
Eugénol	97-53-0	3,6	0,1	Phénol

5.1.5. Profil chimique de l'HE de bergamote (*Citrus bergamia*)

L'HE de bergamote présente une composition (Tableau 9, Annexe 6) constituée en majorité de monoterpènes hydrocarbonés et d'esters. Le limonène est le composé principal et représente environ 30,4 % de la composition totale. L'acétate de linalyle est également présent en proportion non-négligeable ($\approx 28,8$ %), suivi par le linalol ($\approx 16,6$ %). D'autres monoterpènes insaturés, tels que le γ -terpinène, le β -pinène et le β -myrcène, sont détectés à des proportions plus faibles (Annexe 6).

Tableau 9 : Composés majoritaires de l'HE de bergamote (*Citrus bergamia*) analysés en GCMS (n=3).

Composé	CAS	% relatif	σ (%)	Fonction organique
(D)-Limonène	138-86-3	30,4	0,1	Hydrocarbure (alcène)
Acétate de linalyle	115-95-7	28,8	0,2	Ester
Linalol	78-70-6	16,6	0	Alcool
β -pinène	127-91-3	7,63	0	Hydrocarbure (alcène)

5.1.6. Profil chimique de l'HE de romarin (*Rosmarinus officinalis*)

La composition de l'HE de romarin (Tableau 10, Annexe 3) est caractérisée, elle, par une forte proportion de monoterpénoïdes. Les composés majoritaires sont l'eucalyptol (1,8-cinéole), représentant environ 21,3 %, et le camphre ($\approx 19,9$ %). L' α -pinène constitue également une fraction importante de l'HE ($\approx 14,0$ %). D'autres composés, tels que le camphène, le bornéol et le β -pinène, contribuent au profil global dans des proportions toutefois plus faibles (Annexe 3).

Tableau 10 : Composés majoritaires de l'HE de romarin (*Rosmarinus officinalis*) analysés en GCMS (n=3).

Composé	CAS	% relatif	σ (%)	Fonction organique
Eucalyptol (1,8-cinéole)	470-82-6	21,3	0,1	Éther
Camphre	76-22-2	19,9	0,1	Cétone
α -Pinène	80-56-8	14	0,1	Hydrocarbure (alcène)
Camphène	79-92-5	9,29	0,0	Hydrocarbure (alcène)

5.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (MIC) sur milieu solide

Deux séries d'expériences indépendantes ont été réalisées sur milieu V8-agar, consistant à mesurer la croissance mycélienne de trois géotypes distincts de *P. infestans* exposés à différentes concentrations des HEs caractérisées ci-dessus. Ces mesures (Tableau 11) de croissance ont permis, dans un premier temps, de déterminer les MIC de chaque HE et ainsi de sélectionner les traitements présentant la plus forte activité anti-oomycète. Dans un second temps, des extraits enrichis en composés majoritaires ont été testés en comparaison avec les HEs naturelles selon le même protocole afin d'évaluer leur contribution à l'activité biologique observée.

La croissance a été exprimée sous forme de diamètre mycélien moyen (\pm écart-type). La MIC est définie comme la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance n'est observée au-delà de l'inoculum initial (0,5 cm).

Il est à noter qu'une phase de « pré-expérimentation » a été réalisée afin d'identifier les ordres de grandeur des concentrations efficaces autour des valeurs de MIC attendues. Cette étape a permis de sélectionner des concentrations pertinentes pour les expérimentations.

Tableau 11 : Diamètres des différents génotypes de *P. infestans* (après 7 jours de développement ; n=3) en présence de milieux enrichis avec différentes HEs afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (MIC). Les cases grisées correspondent à une inhibition complète de la croissance mycélienne.

MIC		Moyenne (en cm) \pm écart-type					
Génotype de <i>P. infestans</i>	Concentration en HE ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Origan	Clou de girofle	Cannelle de Chine	Cannelle de Ceylan	Bergamote	Romarin
EU-37	0,2	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
	0,1	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.0
	0,05	0.5 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	1.7 \pm 1.6	1.6 \pm 0.8
	0,025	1.6 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.3	3.5 \pm 0.1	4.8 \pm 0.2	3.0 \pm 0.0
EU-36	0,2	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
	0,1	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.7 \pm 0.2
	0,05	1.1 \pm 0.0	1.4 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.0
	0,025	1.5 \pm 0.0	1.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.0	2.6 \pm 0.1	/	1.6 \pm 0.0
EU-13	0,2	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
	0,1	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	1.6 \pm 0.1
	0,05	0.5 \pm 0.0	1.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.8 \pm 0.2
	0,025	1.3 \pm 0.0	2.5 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	2.4 \pm 0.0	2.7 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2

5.2.1. Etude de l'activité anti-oomycète des HEs

Génotype EU-37

En ce qui concerne la souche EU-37, une activité dose-dépendante contre la croissance mycélienne est observée pour l'ensemble des HEs testées (Tableau 11). Aux concentrations de 0,2 et 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, toutes les HEs entraînent une inhibition totale de la croissance avec un diamètre de croissance équivalent à l'inoculum initial, à l'exception de l'HE de romarin (MIC = 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

À 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$, l'HE d'origan ainsi que celles de cannelle de Chine et de cannelle de Ceylan maintiennent une inhibition totale. En revanche, une croissance mycélienne est observée pour le clou de girofle (1,0 \pm 0,0 cm), la bergamote (1,7 \pm 1,6 cm) et le romarin (1,6 \pm 0,8 cm).

À 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$, la croissance mycélienne reprend pour l'ensemble des HEs, avec des diamètres compris entre 0,9 \pm 0,3 cm pour la cannelle de Chine et 4,8 \pm 0,2 cm pour la bergamote. La MIC pour la souche EU-37 est ainsi atteinte à 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour l'origan, la cannelle de Chine et la

cannelle de Ceylan, tandis qu'elle est supérieure à cette concentration pour le clou de girofle, la bergamote et le romarin.

Génotype EU-36

Pour EU-36, une inhibition totale de la croissance est observée à 0,2 et 0,1 $\mu\text{L/mL}$ pour toutes les HEs (à l'exception de l'HE de romarin ; MIC = 0.2 $\mu\text{L/mL}$), avec un diamètre mycélien limité à l'inoculum initial (Tableau 11).

À 0,05 $\mu\text{L/mL}$, seule l'HE de cannelle de Chine maintient une inhibition complète, tandis qu'une croissance partielle est observée pour l'origan ($1,1 \pm 0,0$ cm), le clou de girofle ($1,4 \pm 0,2$ cm), la cannelle de Ceylan ($1,3 \pm 0,1$ cm), la bergamote ($1,8 \pm 0,1$ cm) et le romarin ($1,1 \pm 0,0$ cm). Au-delà de cette concentration, toutes les croissances mycéliennes reprennent.

La MIC pour la souche EU-36 est ainsi atteinte à 0,05 $\mu\text{L/mL}$ pour la cannelle de Chine, à 0,2 $\mu\text{L/mL}$ pour le romarin et à 0,1 $\mu\text{L/mL}$ pour les autres HEs.

Génotype EU-13

Enfin, EU-13 subit une inhibition totale de la croissance à 0,2 et 0,1 $\mu\text{L/mL}$ pour toutes les HEs (à l'exception de l'HE de romarin (MIC = 0.2 $\mu\text{L/mL}$)), avec un diamètre mycélien limité à l'inoculum initial (Tableau 11). À 0,05 $\mu\text{L/mL}$, les HEs d'origan et de cannelle de Chine inhibent complètement la croissance mycélienne tandis qu'une croissance partielle est observée à la suite de l'inclusion des HEs de clou de girofle ($1,6 \pm 0,2$ cm), de cannelle de Ceylan ($1,1 \pm 0,1$ cm), de bergamote ($1,2 \pm 0,1$ cm) et de romarin ($1,8 \pm 0,2$ cm).

À 0,025 $\mu\text{L/mL}$, la croissance mycélienne est observée pour toutes les HEs, avec des diamètres compris entre $1,0 \pm 0,0$ cm pour la cannelle de Chine et $2,7 \pm 0,2$ cm pour la bergamote. La MIC pour la souche EU-13 est ainsi atteinte à 0,05 $\mu\text{L/mL}$ pour l'origan et la cannelle de Chine, et à 0,1 $\mu\text{L/mL}$ pour les autres HEs.

5.2.2. Etude de l'activité anti-oomycète des composés majoritaires

Les extraits enrichis en composés majoritaires, obtenus par supplémentation des HEs avec leur composé principal ont montré une activité globalement plus marquée contre la croissance mycélienne des trois génotypes de *P. infestans*. Pour EU-37, une inhibition totale de la croissance est observée à partir de 0,1 $\mu\text{L/mL}$ pour l'ensemble des conditions. À 0,05 $\mu\text{L/mL}$, seul le milieu avec l'HE de cannelle et le milieu enrichi en cinnamaldéhyde présentent une croissance mycélienne. À 0,025 $\mu\text{L/mL}$, seul le milieu contenant l'extrait enrichi en carvacrol présente encore une inhibition. Une croissance mycélienne est observée pour les autres conditions. Ainsi, la MIC de EU-37 est de 0,1 $\mu\text{L/mL}$ pour l'HE enrichie en cinnamaldéhyde, de 0,05 $\mu\text{L/mL}$ pour les HEs naturelles et l'HE enrichie en eugénol, et de 0,025 pour l'HE enrichie en carvacrol (Annexe 7).

Pour le génotype EU-36, à 0,1 µL/mL, les HEs naturelles et enrichies induisent une inhibition totale de la croissance. À 0,05 µL/mL une croissance mycélienne est observée uniquement pour les trois HEs naturelles. À 0,025 µL/mL, une croissance est mesurée pour les extraits enrichis en carvacrol ($0,7 \pm 0,1$ cm), en eugénol ($1,7 \pm 0,5$ cm) et en cinnamaldéhyde ($1,4 \pm 0,1$ cm). La MIC pour la souche EU-36 est donc de 0,1 µL/mL pour l'ensemble des HEs naturelles et de 0,05 µL/mL pour les HEs enrichies (Annexe 7).

Chez EU-13, l'ensemble des conditions inhibe également complètement la croissance mycélienne à 0,1 µL/mL. À 0,05 µL/mL la croissance mycélienne est observée uniquement pour les HEs naturelles de cannelle de Ceylan et de clou de girofle. À 0,025 µL/mL, des diamètres de croissance mycélienne sont observés pour les HEs enrichies, ces derniers compris entre $1,0 \pm 0,0$ cm pour le carvacrol et $1,1 \pm 0,1$ cm pour l'eugénol et le cinnamaldéhyde. Ainsi, pour la souche EU-13, la MIC est presque identique (0,1 µL/mL) pour les HEs naturelles à l'exception de l'HE naturelle d'origan, et 0,05 µL/mL pour les HEs enrichies et l'HE naturelle d'origan (Annexe 7).

À l'issue des expérimentations de détermination des MIC, la suite des travaux a été poursuivie exclusivement avec le génotype EU-37 de *P. infestans*. Ce choix repose majoritairement sur les observations réalisées en laboratoire. Ces dernières indiquent que cette souche présentait un état physiologique plus stable (niveau de stress plus faible au cours des cultures) en plus d'une meilleure aptitude à la production de biomasse et au repiquage. Ces caractéristiques font de ce génotype un modèle plus robuste et plus reproductible pour les expérimentations ultérieures.

De plus, les HEs de bergamote et de romarin, ayant montré une activité anti-oomycète plus faible lors des tests de MIC et des expériences préalables au laboratoire, n'ont pas été retenues pour les expérimentations d'approfondissement suivantes.

5.3. Effet des HEs sur la conductivité membranaire de *P. infestans* EU-37

L'effet des trois HEs origan, cannelle et clou de girofle sur *P. infestans* (génotype EU-37) a été étudié par une approche conductimétrique dans le but de mieux comprendre les sites d'action des HEs ayant une activité anti-oomycète sur *P. infestans*.

Cette méthode consiste à mesurer l'évolution de la conductivité du milieu extracellulaire de la biomasse mycélienne après exposition aux traitements d'HEs à différentes concentrations. Ces mesures sont comprises entre 0 et 180 minutes et sont exprimées en pourcentage de la conductivité maximale obtenue après libération totale des ions intracellulaires. Cette approche permet d'évaluer indirectement une éventuelle perméabilisation de la membrane plasmique induite par les HEs, traduite par une fuite ionique vers le milieu extracellulaire et une perturbation des échanges ioniques cellulaires. Les analyses statistiques ont été réalisées uniquement sur la valeur finale de conductivité mesurée après 180 minutes.

Pour l'ensemble des expériences, le témoin négatif présente une augmentation modérée et progressive de la conductivité au cours du temps, correspondant à une fuite ionique basale. À l'inverse, le témoin positif traité au Triton X-100 présente une augmentation rapide et marquée de la conductivité dès les premières minutes, atteignant systématiquement les valeurs les plus élevées en fin de cinétique (Figures 4, 5, 6).

5.3.1. Cinétique de conductimétrie de *P. infestans* traité avec l'HE d'origan

L'exposition du mycélium à l'HE d'origan entraîne une augmentation de la conductivité du milieu extracellulaire au cours du temps (Figure 5). Une phase d'augmentation rapide est observée durant les 20 premières minutes, suivie d'une augmentation plus progressive jusqu'à 180 minutes.

L'amplitude de la réponse est dépendante de la concentration en HE. Les concentrations de 1, 2 et 5 $\mu\text{L/mL}$ induisent des valeurs de conductivité supérieures à celles du témoin négatif sur l'ensemble de la cinétique, tandis que la concentration de 0,2 $\mu\text{L/mL}$ présente une évolution proche de celle du témoin non traité. Le Triton X-100 est un détergent non ionique largement utilisé pour la solubilisation des membranes biologiques. Il a été employé comme témoin positif de perméabilisation membranaire. Son utilisation permet d'induire une libération quasi-totale des ions intracellulaires et ainsi d'établir une valeur de référence correspondant à une conductivité maximale à l'ensemble des temps de mesure.

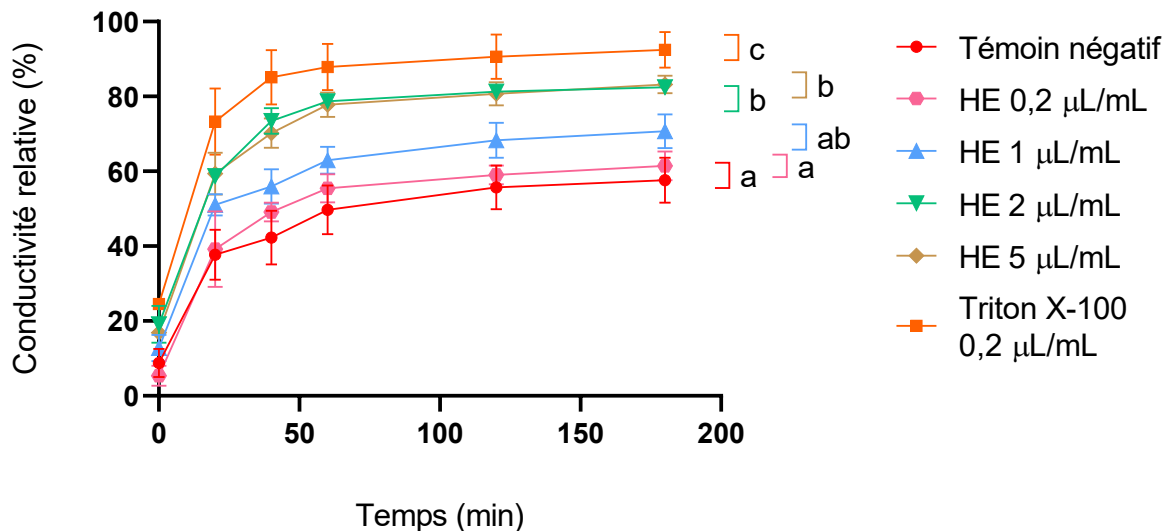


Figure 5 : Cinétique de la conductivité en milieu extracellulaire de la biomasse du génotype EU-37-A2 de *P. infestans* traitée avec différentes concentrations d'HE d'origan en fonction du temps (n=3)

L'analyse des conductivités maximales mesurées après 180 minutes met en évidence des différences significatives entre les conditions (une ANOVA à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey, $p < 0,05$). La concentration de 5 $\mu\text{L/mL}$ présente une conductivité maximale significativement supérieure à celle du témoin négatif et aux concentrations inférieures. Les

concentrations de 1 et 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ présentent des valeurs intermédiaires, significativement supérieures au témoin négatif mais inférieures à la concentration de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. La condition à 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ne diffère pas significativement du témoin négatif. Le témoin positif présente une conductivité maximale significativement supérieure à l'ensemble des autres conditions.

5.3.2. Cinétique de conductimétrie de *P. infestans* traité avec l'HE de cannelle de Chine

Une augmentation progressive de la conductivité du milieu est observée pour l'ensemble des conditions, y compris le témoin négatif, ceci en raison du stress osmotique imposé à la biomasse mycélienne lors de la mise en contact avec le milieu expérimental (Figure 6). Toutefois, l'HE de cannelle induit une augmentation supplémentaire de la conductivité au cours du temps par rapport au témoin négatif, et le témoin positif entraîne une augmentation rapide et importante, caractéristique d'une forte altération de l'intégrité membranaire.

La conductivité mesurée dépend de la concentration en HE de cannelle. La concentration de 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ présente une cinétique similaire à celle du témoin négatif. En revanche, les concentrations de 1, 2 et 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ induisent des augmentations plus importantes de la conductivité. La concentration de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ conduit à la conductivité la plus élevée parmi les traitements à l'HE de cannelle, sans toutefois atteindre les valeurs du témoin positif.

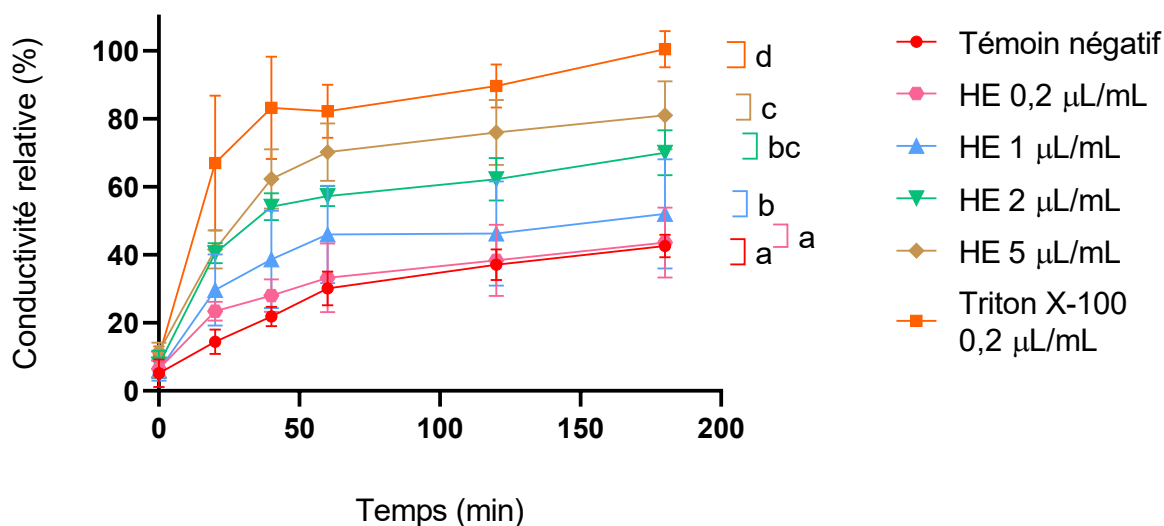


Figure 6 : Cinétique de la conductivité en milieu extracellulaire de la biomasse du génotype EU-37-A2 de *P. infestans* traitée avec différentes concentrations d'HE de cannelle en fonction du temps (n=3)

Les conductivités maximales mesurées après 180 minutes diffèrent significativement entre les conditions (une ANOVA à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey, $p < 0,05$). La concentration de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ présente une conductivité maximale significativement supérieure à celles obtenues avec 1 et 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Ces deux concentrations présentent des valeurs intermédiaires,

significativement supérieures au témoin négatif. La concentration de 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ne diffère pas significativement du témoin négatif. Le témoin positif présente la conductivité maximale la plus élevée et diffère significativement de toutes les autres conditions.

5.3.3. Cinétique de conductimétrie de *P. infestans* traité avec l'HE de clou de girofle

L'exposition du mycélium à l'HE de clou de girofle entraîne une augmentation de la conductivité du milieu extracellulaire au cours du temps, qui est dépendante de la concentration en HE (Figure 7). La concentration de 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ induit une augmentation faible de la conductivité. La conductivité maximale après 180 minutes est non significativement différente de celle du témoin négatif. Les concentrations de 1, 2 et 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ provoquent des augmentations plus importantes, observables dès les premiers temps de mesure. La concentration de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ présente la conductivité la plus élevée parmi les traitements à l'HE de girofle.

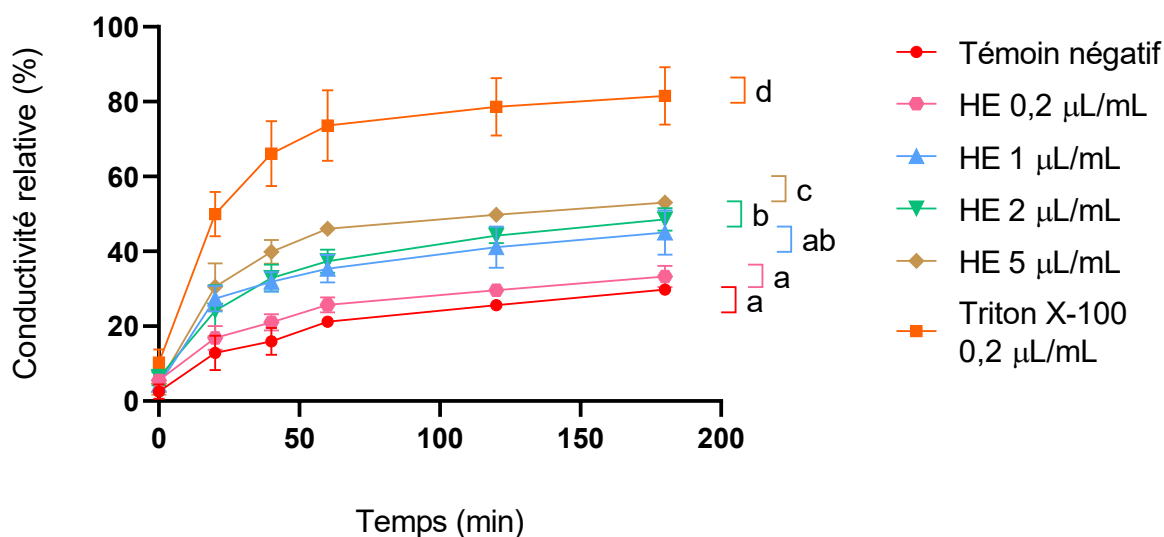


Figure 7 : Cinétique de la conductivité en milieu extracellulaire de la biomasse du génotype EU-37-A2 de *P. infestans* traitée avec différentes concentrations d'HE de clou de girofle en fonction du temps (n=3)

L'analyse des conductivités maximales mesurées après 180 minutes met en évidence des différences significatives entre les conditions (une ANOVA à un facteur, suivie d'un test post-hoc de Tukey, $p < 0,05$). La concentration de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ présente une conductivité maximale significativement supérieure à celles observées pour les concentrations inférieures. Les concentrations de 1 et 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ présentent des valeurs intermédiaires, significativement supérieures au témoin négatif. La condition à 0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ne diffère pas significativement du témoin négatif. Le témoin positif présente une conductivité maximale significativement supérieure à l'ensemble des traitements à l'HE.

5.4. Détection de la production de ROS par fluorescence (DCFH-DA)

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été évaluée par suivi de la fluorescence de la sonde DCFH-DA à l'aide d'un spectrophotomètre à lecteur de microplaques. Les mesures ont été réalisées en cinétique sur une durée de 2 h (7200 s) sur les spores de *P. infestans* (génotype EU-37). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UA) et interprétés de manière relative entre les différentes conditions. Pour chaque expérimentation, six conditions ont été testées et chaque condition a été réalisée en triplicat biologique ($n = 3$). Le tert-butyl hydroperoxyde (TBHP) a été utilisé comme témoin positif de stress oxydatif en raison de sa capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène après pénétration intracellulaire. Son application permet d'induire une production élevée et reproductible de ROS.

L'analyse statistique a été réalisée sur les valeurs de fluorescence mesurées à $t = 2$ h.

5.4.1. Effet des HEs de clou de girofle et de cannelle sur la production de ROS

L'exposition des zoospores aux HEs de girofle et de cannelle entraîne une augmentation du signal de fluorescence par rapport au témoin négatif, indiquant une production accrue de ROS (Figures 8, 9).

L'analyse statistique a mis en évidence que la concentration 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'HE de cannelle de Chine présente le niveau de fluorescence le plus élevé et ne diffère pas significativement du témoin positif. Les concentrations 0,0125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'HE de cannelle et 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'HE de clou de girofle montrent également une différence significative du signal fluorescent après 2h par rapport au témoin négatif mais restent intermédiaires entre le témoin négatif et le témoin positif. À l'inverse, seule la concentration 0,0125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'HE de clou de girofle n'est pas significativement différente du témoin négatif.

Ces résultats indiquent une induction des ROS dépendante de la concentration en HE, plus marquée pour l'HE de cannelle que pour celle de girofle aux concentrations testées.

Le suivi cinétique de la fluorescence sur 2 h montre une augmentation progressive du signal pour l'ensemble des conditions. Les profils obtenus en présence de l'HE de cannelle, en particulier à 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$, présentent des pentes plus élevées et se rapprochent de celles du témoin positif, tandis que les profils associés à l'HE de clou de girofle restent intermédiaires entre les témoins négatif et positif (Figures 8, 9).

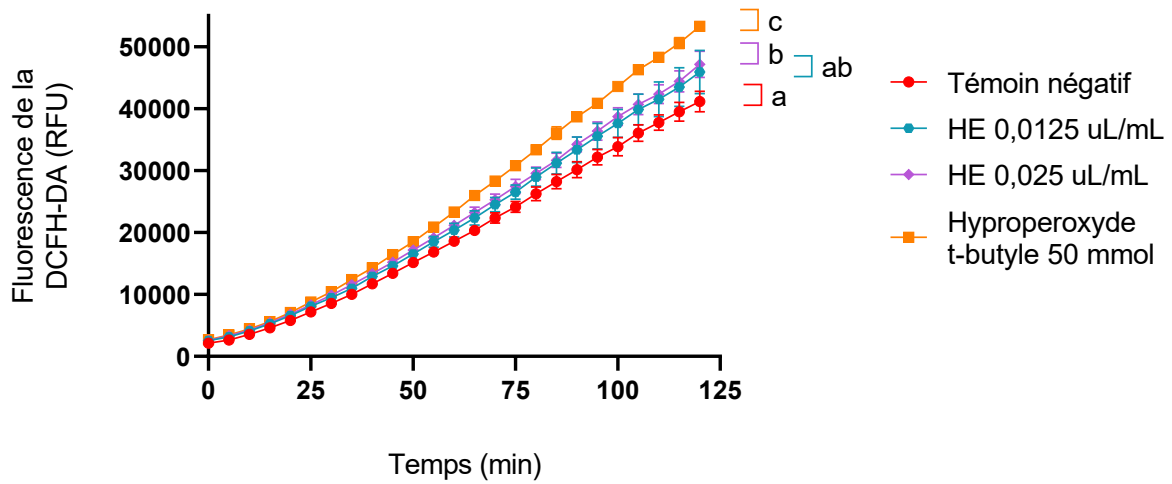


Figure 8 : Cinétique de fluorescence de suspensions de spores du génotype EU-37-A2 de *P. infestans* traitée avec différentes concentrations d'HE de girofle en fonction du temps (n=3)

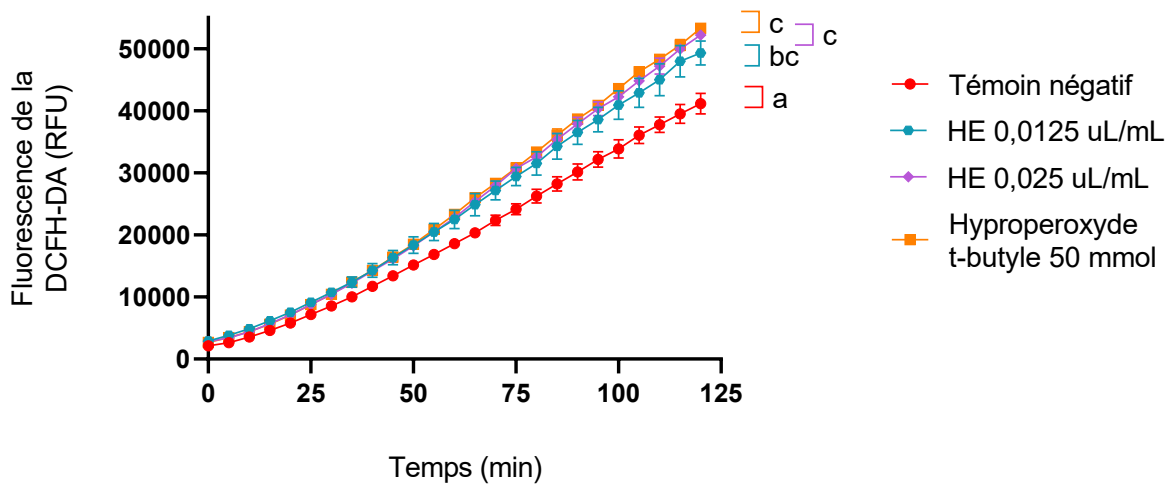


Figure 9 : Cinétique de fluorescence de suspensions de spores du génotype EU-37-A2 de *P. infestans* traitée avec différentes concentrations d'HE de cannelle de chine en fonction du temps (n=3)

5.4.2. Effet de l'HE d'origan sur la production de ROS

L'analyse des valeurs de fluorescence mesurées après 2 h met en évidence une augmentation significative du signal pour la concentration 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$ d'HE d'origan, qui présente des niveaux de fluorescence comparables à ceux du témoin positif et significativement supérieurs au témoin négatif (Figure 10). La concentration 0,0125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ présente des niveaux intermédiaires de fluorescence mais ne diffère pas significativement du témoin négatif.

Le suivi cinétique montre une augmentation progressive du signal fluorescent pour toutes les conditions, avec une intensité dépendante de la concentration en HE.

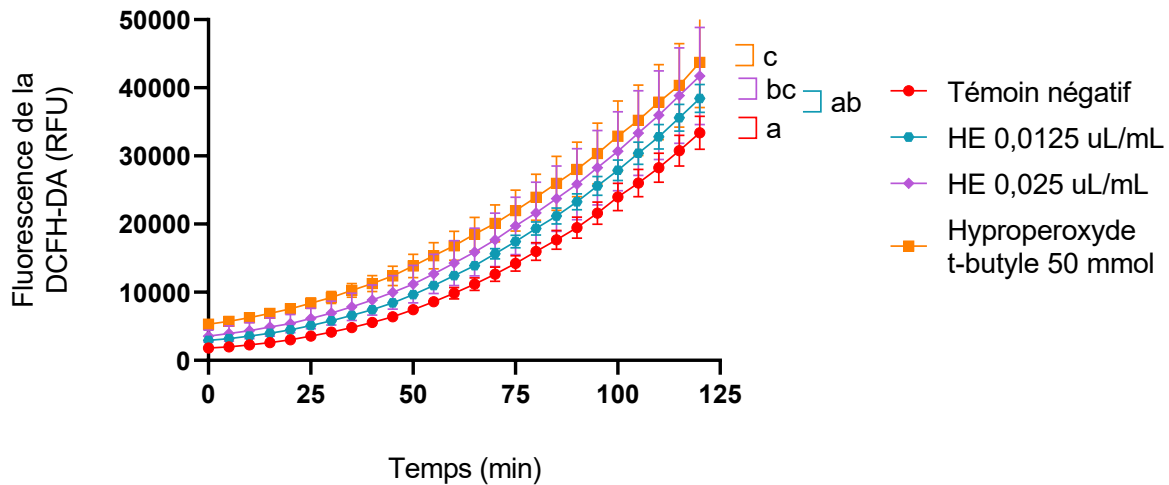


Figure 10 : Cinétique de fluorescence de suspensions de spores du génotype EU-37-A2 de *P. infestans* traitée avec différentes concentrations d'HE d'origan en fonction du temps (n=3)

5.5. Etude de la dynamique de pénétration

5.5.1. Validation analytique du protocole

Afin de valider la pertinence analytique du protocole de dynamique de pénétration (des HEs dans le mycélium de *P. infestans*) et le choix du couple de solvants d'extraction des composés majoritaires des HEs, deux composés modèles présentant des propriétés physico-chimiques volontairement extrêmes ont été utilisés. Le méthyl-palmitate, ester méthylique de l'acide palmitique et composé fortement apolaire, a été sélectionné comme sonde lipophile, tandis que l'acide *p*-coumarique, plus polaire, a été utilisé comme sonde hydrophile. En raison de sa faible volatilité et de son caractère non analysable directement par GC-MS, l'acide *p*-coumarique a nécessité une étape préalable de dérivatisation afin de permettre sa détection et sa quantification.

Après mise en contact de manière séparée de ces composés avec le mycélium de *P. infestans*, des extractions ont été réalisées à l'aide d'hexane, d'isopropanol et d'eau, avant analyse des fractions par GC-MS. Les résultats obtenus montrent que le méthyl-palmitate est exclusivement extrait par l'hexane, aucun signal n'étant détecté dans les extraits à l'isopropanol ou à l'eau, confirmant son caractère strictement apolaire. À l'inverse, l'acide *p*-coumarique est majoritairement extrait par l'isopropanol, qui permet de récupérer environ 80 % du composé, tandis que l'hexane n'en extrait qu'environ 20 %. Ces résultats confirment la sélectivité du couple de solvants et la cohérence du protocole vis-à-vis de composés de polarité contrastée. Le choix de ces deux sondes de polarité extrême constitue ainsi un test contraignant du protocole, permettant de démontrer que, si les solvants sont capables d'extraire efficacement ces composés limites, ils sont *a fortiori* adaptés à l'extraction de molécules de polarités intermédiaires telles que le carvacrol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde, constituants majoritaires des HEs étudiées.

Par ailleurs, une récupération du mycélium entre les différentes extractions par filtration sous vide sur Büchner avait initialement été envisagée sur base du travail précédent de Charline Dessilly. Toutefois, des essais préliminaires ont mis en évidence des pertes importantes pouvant atteindre environ 40 % lors de cette étape. Ces pertes sont attribuées à la volatilisation des composés des HEs lors des filtrations successives. Afin de limiter ces pertes et de préserver la représentativité des fractions analysées, cette approche a été abandonnée au profit d'une récupération du mycélium par centrifugation, mieux adaptée à l'étude de composés volatils et compatible avec l'objectif de l'analyse cinétique.

5.5.2. Dynamique de pénétration des HEs et répartition des composés majoritaires au sein des différents compartiments cellulaires de *P. infestans*

La dynamique de pénétration des composés majoritaires des HEs a été étudiée à un temps unique de 1h, par quantification relative (%) de chaque composé après extraction sélective par solvant. Les pourcentages relatifs ont été exprimés par rapport à la quantité totale du composé initialement introduit dans le milieu expérimental, considérée comme 100 %. Les valeurs mesurées dans chaque fraction correspondent ainsi à la proportion du composé initialement ajouté et non à une normalisation sur la quantité totale récupérée après fractionnement. Ces résultats ont pu être obtenus via des courbes de calibrages externes (Annexe 8).

Les différents solvants utilisés ont été définis en fonction des différents compartiments cellulaires ciblés. L'eau va permettre d'extraire les composés adsorbés à l'extérieur de la paroi de *P. infestans*. L'isopropanol permet d'extraire les composés associés à la paroi cellulaire. L'hexane permet d'extraire les composés associés à la membrane, et l'hexane combiné à un traitement à l'Ultra-Turrax permet d'accéder à la fraction intracellulaire (cytoplasmique).

Il est à noter qu'une proportion importante de chacun des composés majoritaires (respectivement carvacrol, eugénol et cinnamaldéhyde) des HEs testées est retrouvée dans l'émulsion d'origine, représentant environ 40 à 50 % du signal pour l'ensemble des composés étudiés. Cette fraction correspond au composé n'ayant pas été adsorbé ou solubilisé dans aucune structure cellulaire. Cette fraction ne représente donc pas une quantité appartenant à un compartiment biologique à proprement parler. La dynamique de pénétration ici présentée se concentre ainsi sur la répartition des composés au sein des compartiments cellulaires.

Les expériences ont été réalisées lors de deux séries expérimentales indépendantes, chacune comprenant trois répétitions biologiques (n = 3). Un facteur de reproductibilité a été intégré comme facteur bloc dans l'analyse statistique afin de tenir compte des variations inter-journalières observées.

En se limitant aux compartiments cellulaires, les résultats montrent que les composés majoritaires s'associent préférentiellement au milieu intracellulaire (Figure 12) avec une contribution plus modérée de la paroi tandis que la fraction associée à la membrane reste minoritaire dans l'ensemble des conditions étudiées.

Pour le carvacrol, les fractions adsorbées à la paroi cellulaire (eau) représentent environ 5 ± 3 % et la fraction extraite à l'isopropanol correspondant à la paroi représente 12 ± 6 %. La fraction membranaire représente environ 4 ± 2 %, tandis que la fraction intracellulaire atteint 14 ± 6 % du composé total.

Le cinnamaldéhyde présente une répartition comparable avec une adsorption à la paroi limitée (3 ± 1 %), une fraction paroi extraite à l'isopropanol d'environ 4 ± 2 %, une fraction membranaire faible (2 ± 1 %) et une fraction intracellulaire représentant environ 13 ± 2 %.

Pour l'eugénole, la fraction adsorbée à la paroi représente 3 ± 1 % et environ 5 ± 3 % pour la fraction absorbée par la paroi, la fraction membranaire environ 3 ± 2 % et la fraction intracellulaire environ 8 ± 3 % du composé total.

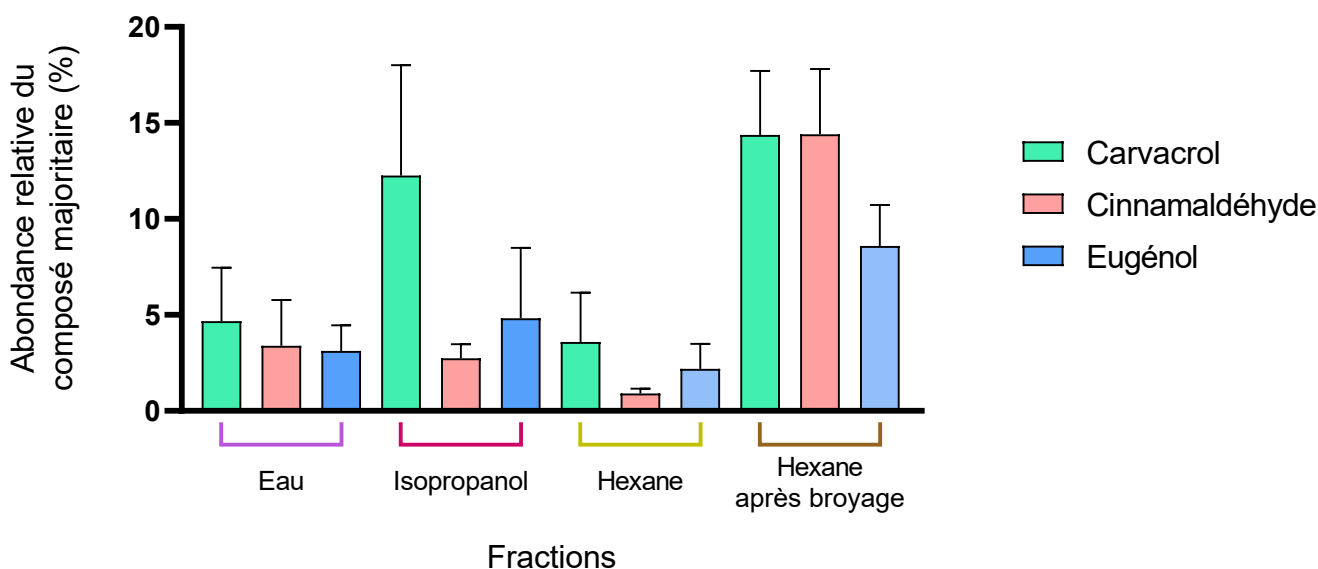


Figure 12 : % relatif des différents composés majoritaires des HEs au sein des différents compartiments cellulaires à la suite de l'extraction avec des solvants de polarité décroissante (n=3). Les couples solvant/compartiment se détaillent comme suit : Eau = Adsorption à la paroi - Isopropanol = Absorption à la paroi - Hexane = Membrane plasmique - Hexane après broyage = Milieu intracellulaire.

5.5.3. Analyse statistique et reproductibilité

La répartition relative des composés majoritaires des HEs au sein des différents compartiments cellulaires de *P. infestans* a été étudiée à l'aide d'une analyse de variance à deux facteurs biologiques, comprenant le type de composé et le compartiment cellulaire. La série expérimentale a également été intégrée comme facteur bloc afin de tenir compte de la variabilité inter-expérimentale.

Les résultats mettent en évidence un effet hautement significatif du compartiment cellulaire sur les pourcentages relatifs des différents composés mesurés ($p < 0,001$), indiquant que la localisation des composés dépend principalement de la nature du compartiment considéré. Un effet significatif du composé est également observé ($p < 0,05$), suggérant que la structure chimique des molécules influence leur répartition relative. En revanche, aucune interaction significative entre le composé et le compartiment n'est détectée, ce qui indique que l'effet du compartiment s'exerce de manière globalement similaire pour l'ensemble des composés étudiés.

Afin d'identifier plus précisément les différences entre composés au sein de chaque compartiment, un test post-hoc de Tukey a été réalisé (Figure 11). Les résultats montrent qu'aucune différence significative n'est observée entre les composés dans les fractions correspondant à l'émulsion, à l'adsorption pariétale, à la membrane ou à la fraction intracellulaire. En revanche, dans la fraction isopropanol, associée à la paroi cellulaire, la proportion de carvacrol est significativement plus élevée que celles du cinnamaldéhyde et de l'eugénol ($p < 0,05$).

Ces résultats indiquent que, bien que la répartition des composés soit principalement gouvernée par le compartiment cellulaire, des différences liées à la nature chimique des molécules peuvent apparaître de manière localisée, notamment au niveau de la paroi cellulaire.

La reproductibilité de la manipulation est jugée satisfaisante, les tendances de répartition étant similaires entre les deux séries expérimentales. Néanmoins, une variabilité plus importante est observée pour le carvacrol, en particulier dans les fractions associées à la paroi et à la fraction intracellulaire. Cette variabilité se traduit par des écarts-types plus élevés et s'explique par une différence marquée entre les deux runs expérimentaux pour ce composé, sans toutefois remettre en cause les tendances générales observées.

Comparaison des composés par compartiment (Tukey)

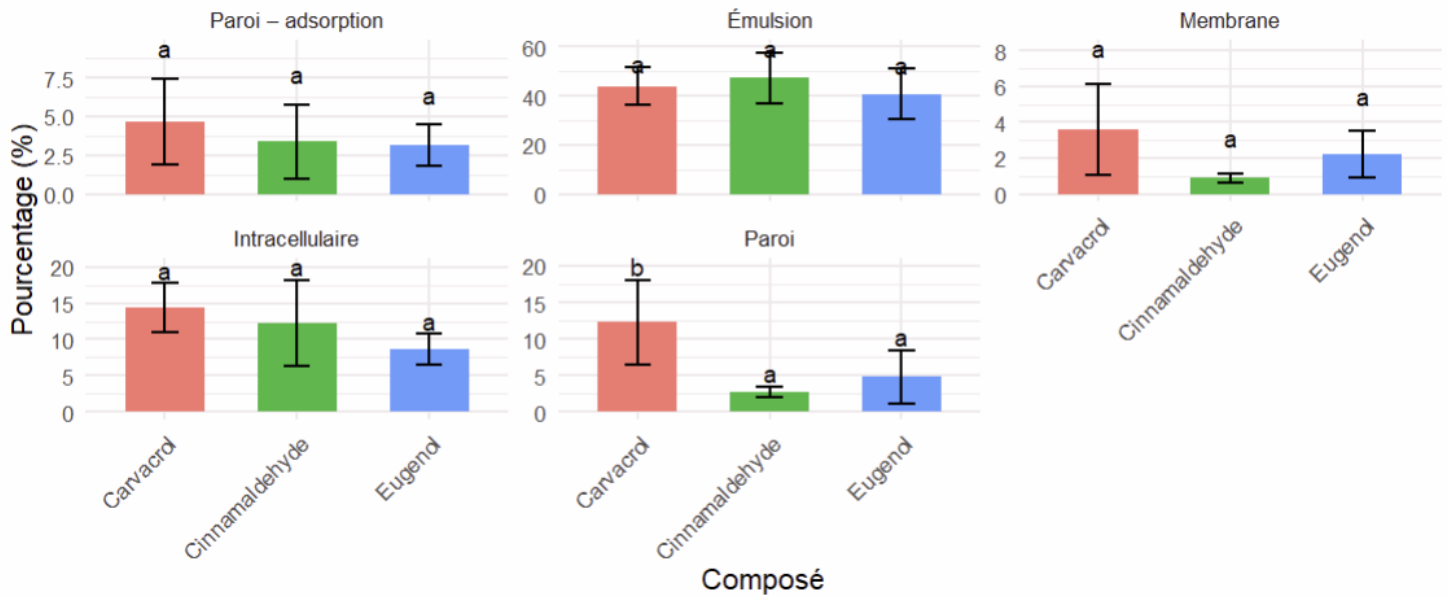


Figure 11 : Dynamique de pénétration des HEs et répartition des composés majoritaires au sein des différents compartiments cellulaires de *P. infestans* : Comparaison des composés majoritaires au sein de chaque compartiment cellulaire à l'aide d'un test de Tukey, à la suite d'une analyse de variance à deux facteurs biologiques (composé et compartiment) avec intégration du set expérimental comme facteur bloc. Les lettres différentes indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) ($n=3$).

5.5.4. Synthèse des résultats de la dynamique de pénétration des HEs dans le mycélium de *P. infestans*

Dans les conditions expérimentales étudiées, les composés majoritaires des HEs montrent une pénétration préférentielle jusqu'au milieu intracellulaire, une adsorption modérée au niveau de la paroi cellulaire et une solubilisation limitée à la membrane. À l'exception du carvacrol au niveau de la paroi cellulaire, aucune différence significative de répartition n'est observée entre les trois molécules quantifiées.

6. DISCUSSION

6.1. Caractérisation du profil chimique des HEs par GC-MS

L'analyse GC-MS des HEs étudiées met en lumière des profils chimiques globalement en lien avec ceux décrits dans la littérature pour les espèces végétales correspondantes. Les écarts observés restent limités et peuvent être attribués à des facteurs fréquemment rapportés, tels que l'origine botanique, l'organe de la plante extrait, les conditions de culture ou les paramètres conditionnant les procédés d'extraction (Burt, 2004).

L'HE d'origan présente un chémotype dominé par le carvacrol ($\approx 50\%$), accompagné de proportions notables de p-cymène, de γ -terpinène et de thymol. Le profil chimique de l'origan analysé a révélé un chémotype au carvacrol, bien caractéristique de l'HE d'*Origanum vulgare*,

souvent riche en monoterpènes phénoliques (Aykut Tonk *et al.*, 2010 ; Bakkali *et al.*, 2008). En outre, les présences simultanées de p-cymène et de γ -terpinène, considérés comme des précurseurs métaboliques du carvacrol et du thymol, sont fréquemment rapportées pour ce chémotype.

Le profil chimique, dominé par l'eugénol et l'acétate d'eugényle, correspond à celui classiquement décrit pour les HEs extraites des boutons floraux séchés de *Syzygium aromaticum* (Wimalasena *et al.*, 2019 ; Bakkali *et al.*, 2008). La forte abondance conjointe de ces deux molécules peut s'expliquer par leur proximité chimique, l'acétate d'eugényle étant l'ester de l'eugénol, et par leur probable origine commune au sein des mêmes voies métaboliques phénylpropanoïdes chez la plante. En revanche, le β -caryophyllène, est issu de la voie des terpènes et provient donc d'une voie métabolique distincte de celle de l'eugénol. Ceci souligne la diversité des voies métaboliques qui contribuent au chémotype d'une HE.

L'HE de cannelle de Chine (extraite des feuilles) analysée se distingue par une très grande abondance de (*E*)-cinnamaldéhyde accompagné par des quantités plus faibles d'aldéhydes et d'esters aromatiques. Ce profil est en accord avec les données publiées pour les HEs de *Cinnamomum cassia*, généralement caractérisées par une dominance marquée du cinnamaldéhyde (Knauth *et al.*, 2018). Comparativement à la cannelle de Chine, l'HE de cannelle de Ceylan (extraite de l'écorce) présente une composition plus diversifiée, bien que le (*E*)-cinnamaldéhyde demeure le composé majoritaire. Cette différence de profil entre les deux espèces du genre *Cinnamomum* est bien documentée et deux facteurs influencent cette différence. Premièrement, l'espèce *zeylicanum* est généralement décrite comme moins concentrée en cinnamaldéhyde et plus riche en composés aromatiques secondaires. Deuxièmement, ce ne sont pas les mêmes organes de la plante qui sont utilisés (feuilles vs écorce) (Ranasinghe *et al.*, 2013).

L'HE de bergamote présente un profil typique des HEs d'agrumes, dominé par le limonène, l'acétate de linalyle et le linalol. Ce type de composition est largement rapporté dans la littérature pour les HEs obtenues par expression à froid des écorces de *Citrus bergamia* (Cordeiro *et al.*, 2023).

L'HE de romarin analysée est caractérisée par une forte proportion de monoterpènes oxygénés, principalement l'eucalyptol (1,8-cinéole) et le camphre, accompagnés d' α -pinène et de camphène. Ce profil correspond au chémotype cinéole/camphre fréquemment décrit pour les HEs de *Rosmarinus officinalis* issues des feuilles (Boutekedjiret *et al.*, 2003).

De manière générale, l'analyse des compositions chimiques met en évidence une distinction marquée entre les HEs étudiées selon des grandes voies métaboliques dont sont issus leurs composés majoritaires. Les HEs d'origan, de girofle, de cannelle de Chine et de cannelle de Ceylan

sont majoritairement composées de métabolites issus de la voie des phénylpropanoïdes, tels que le carvacrol, l'eugénol ou le cinnamaldéhyde, caractérisés par des fonctions phénoliques ou aldéhydes aromatiques. À l'inverse, les HEs de bergamote et de romarin présentent un profil dominé par des composés terpéniques, principalement des monoterpènes et des monoterpènes oxygénés, issus de la voie métabolique des terpènes. Cette différenciation nette des origines biosynthétiques constitue un élément important pour l'interprétation des activités biologiques observées par la suite (Vogt, 2010 ; Bakkali *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble, les chémotypes obtenus pour les différentes HEs analysées sont conformes aux profils généralement décrits dans la littérature pour les espèces végétales et les organes extraits correspondants. Ces résultats confirment la représentativité et la qualité des HEs utilisées dans ce travail.

6.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (MIC) sur milieu solide

6.2.1. Activité anti-oomycètes des HEs et rôle des composés majoritaires

Les résultats obtenus sur milieu solide montrent que les HEs testées présentent une activité anti-oomycètes marquée vis-à-vis de *P. infestans* (Figure 13), avec des MIC comprises, pour la majorité des traitements, entre 0,05 et 0,1 µL/mL selon le génotype. De manière générale, les HEs d'origan, de cannelle et de clou de girofle se distinguent par une activité inhibitrice plus prononcée que celles de bergamote et de romarin, ce qui est cohérent avec leur composition chimique révélée par les analyses GC-MS. Ces dernières sont en effet majoritairement composées de terpènes, principalement des hydrocarbures insaturés, généralement décrits comme présentant une activité antimicrobienne plus faible. Par ailleurs, la forte volatilité de ces terpènes pourrait conduire à une diminution de leur concentration effective dans le milieu de culture après coulage du milieu, contribuant ainsi à une sous-estimation de leur activité biologique réelle.

6.2.2. Comparaison entre HEs et extraits enrichis

Lors de la première expérimentation, les HEs d'origan et de cannelle (de Chine et de Ceylan) présentent systématiquement les MIC les plus faibles (et donc des activités anti-oomycètes plus fortes), en particulier pour EU-37 et EU-13. Ces résultats sont cohérents avec les études rapportant une forte activité anti-oomycètes des HEs riches en composés phénoliques ou aromatiques contre des oomycètes et des champignons phytopathogènes (Bakkali *et al.*, 2008 ; Nazzaro *et al.*, 2013).

À l'inverse, les HEs de bergamote et de romarin présentent des MIC plus élevées ou non atteintes dans la gamme de concentrations testée. Ces HEs sont majoritairement composées de monoterpènes insaturés et oxygénés (limonène, linalol, 1,8-cinéole), généralement décrits comme moins actifs sur la membrane fongique que les métabolites issus de la voie des phénylpropanoïdes (Hyldgaard *et al.*, 2012).

Les différences observées entre les souches EU-13, EU-36 et EU-37 suggèrent par ailleurs une variabilité inter-souches de la sensibilité aux HEs. Ce phénomène est déjà décrit chez *P. infestans* et attribué à des différences de composition membranaire (teneur et nature des stérols et des acides gras). Ces différences sont connues pour influencer la fluidité et la perméabilité membranaire en plus des capacités de réponse aux substances xénogènes (Judelson & Blanco, 2005).

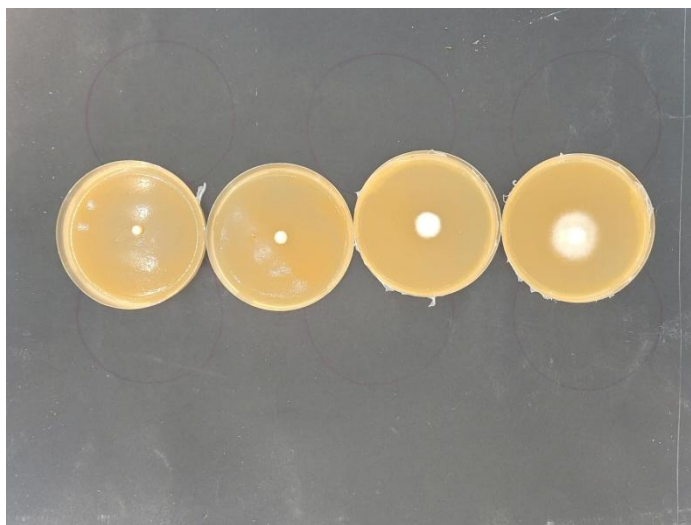


Figure 13 : Photographie de *P. infestans* (EU-13) lors de la détermination des MIC sur milieux gélosés (n=3).

6.2.3. Effet de l'enrichissement en composés majoritaires

La seconde expérimentation met en lumière l'impact des composés majoritaires sur l'activité antifongique observée. Pour les trois souches étudiées, l'enrichissement en carvacrol, eugénol ou cinnamaldéhyde conduit globalement à une diminution des MIC par rapport à chacune de leur HE correspondante. Cela appuie, dans la limite de cette expérimentation, l'hypothèse selon laquelle ces molécules sont principalement celles responsables de l'activité anti-oomycètes et que l'augmentation de leur proportion permet d'augmenter le pouvoir inhibitoire.

En particulier, l'extrait enrichi en carvacrol présente les MIC les plus faibles, atteignant 0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour la souche EU-37 et 0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$ pour les souches EU-36 et EU-13. Le carvacrol est décrit comme une molécule capable de perturber l'intégrité de la membrane cytoplasmique, d'augmenter sa perméabilité ionique et de provoquer une perte de potentiel membranaire causant

ainsi une forte inhibition sur *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* (Ultee *et al.*, 2002 ; Lambert *et al.*, 2001).

Les extraits enrichis en eugénol et cinnamaldéhyde présentent également une activité anti-oomycètes accrue par rapport aux HEs, bien que légèrement inférieure à celle du carvacrol enrichi. Ces composés sont connus pour interagir avec les lipides membranaires et les protéines, entraînant une altération de la structure membranaire et une inhibition de processus cellulaires essentiels, notamment la respiration mitochondriale et la synthèse de la paroi (Neri *et al.*, 2006 ; Shreaz *et al.*, 2016).

6.2.4. Effet fongicide ou fongistatique des mélanges testés

Enfin, une expérimentation complémentaire a été réalisée afin de distinguer un effet fongistatique d'un effet fongicide des HEs. Les inocula issus des conditions correspondant aux MIC ont été repiqués sur des boîtes de Petri contenant un milieu V8-agar non amendé afin d'évaluer la reprise éventuelle de la croissance mycélienne. Dans l'ensemble des conditions testées, une reprise normale de la croissance mycélienne a été observée, indiquant que l'exposition aux HEs aux concentrations correspondant aux MIC n'entraîne pas une destruction irréversible du mycélium. Ces résultats montrent que, dans les conditions expérimentales étudiées, l'activité des HEs naturelles et des HEs enrichies en composés majoritaires est majoritairement de nature fongistatique.

Il convient toutefois de noter que seules les concentrations correspondant aux MIC ont été évaluées dans cette expérimentation. Plusieurs études ont montré que l'activité des HEs est fortement dose-dépendante, un effet fongistatique est certes observé aux concentrations proches de la MIC mais un effet fongicide peut apparaître à des concentrations plus élevées (Burt, 2004). L'étude de concentrations supra-MIC pourrait ainsi permettre de déterminer si une inhibition irréversible de la croissance de *P. infestans* peut être obtenue dans les conditions expérimentales étudiées.

6.3. Cinétique de conductimétrie

Pour les trois HEs testées, une augmentation de la conductivité relative du milieu extracellulaire est observée en fonction du temps de contact et de la concentration en HE, traduisant une fuite ionique accrue par rapport au témoin négatif. Dans tous les cas, le témoin positif au Triton X-100 induit les valeurs de conductivité les plus élevées.

À concentration équivalente, les HEs d'origan, de cannelle et de clou de girofle provoquent chacune une cinétique de relargage d'ions globalement comparable sur la biomasse de *P. infestans*. Les

différences observées entre HEs se traduisent principalement par des variations de l'amplitude de la conductivité maximale atteinte après 180 minutes.

Pour les trois HEs, les analyses statistiques montrent une séparation claire entre les concentrations efficaces ($\geq 1 \mu\text{L/mL}$) et la concentration la plus faible testée ($0,2 \mu\text{L/mL}$), cette dernière ne différant pas significativement du témoin négatif. Les concentrations élevées induisent systématiquement des conductivités maximales significativement supérieures au témoin négatif, sans toutefois atteindre les valeurs observées pour le témoin positif.

Les traitements de la biomasse de *P. infestans* par les HEs d'origan, de clou de girofle et de cannelle mettent en évidence une augmentation de la conductivité en fonction du temps et dépendant de la concentration. En effet, un effet significatif est observé pour les trois HEs à partir de $1 \mu\text{L/mL}$. Cela traduit directement une fuite progressive d'ions hors du milieu cellulaire du mycélium de l'oomycète. Cette mesure s'avère être un indicateur fréquemment utilisé pour évaluer l'intégrité membranaire chez les micro-organismes (Mani-López *et al.*, 2021).

La conductivité extracellulaire est causée par l'incapacité progressive de la cellule à réguler ses flux ioniques (notamment des ions K^+ et Ca^{2+}). Une augmentation significative de ce paramètre est généralement interprétée comme la conséquence d'une augmentation de la perméabilité membranaire, pouvant résulter d'une désorganisation de la bicouche lipidique ou d'une altération des protéines membranaires (Mani-López *et al.*, 2021).

De façon générale, le témoin positif au Triton X-100 induit la conductivité la plus élevée, rôle typique d'un détergent non ionique, capable de solubiliser les lipides membranaires, induisant dès lors une libération massive et rapide du contenu intracellulaire. D'une manière différente, les HEs induisent une augmentation plus progressive et moins extrême de la conductivité, suggérant une perturbation membranaire partielle, distincte d'une lyse complète (Zhang *et al.*, 2019).

Les cinétiques de relargage observées à la suite du contact avec les trois HEs sont caractérisées par une augmentation rapide de la conductivité dès les premières minutes d'exposition, suivie d'une phase plus progressive jusqu'à 180 minutes. Ce phénomène pourrait être expliqué par un mécanisme en deux étapes souvent décrit pour les composés lipophiles issus des HEs : une partition rapide dans la membrane plasmique, suivie d'une accumulation progressive et d'une amplification des dommages membranaires (OuYang *et al.*, 2019). Ce type de cinétique a déjà été rapporté pour plusieurs composés majeurs d'HEs, notamment le carvacrol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde, dont l'insertion dans la bicouche lipidique modifie la fluidité membranaire, perturbe les gradients électrochimiques et favorise la fuite d'ions vers le milieu extracellulaire (Zhang *et al.*, 2019 ; Shahina *et al.*, 2024).

Les HEs utilisées ont été préalablement caractérisées et présentent une composition dominée par un composé majoritaire : le carvacrol pour l'origan ($\approx 50\%$), l'eugénol pour le clou de girofle ($\approx 63\%$) et le cinnamaldéhyde pour la cannelle ($\approx 67\%$). La composition chimique des HEs préalablement identifiée permet l'interprétation du mécanisme d'action sur une base moléculaire.

Le carvacrol, composé majoritaire de l'HE d'origan, est largement décrit comme un puissant perturbateur membranaire. Sa structure aromatique substituée, conférant une forte lipophilie, associée à la présence d'un groupement hydroxyle phénolique, lui confère un caractère amphiphile favorisant son insertion dans la bicouche lipidique, entraînant une augmentation de la fluidité membranaire et une perte de sélectivité ionique (Zhang *et al.*, 2019). Des études rapportent un phénomène similaire en présence d'eugénol (Ulanowska *et al.*, 2021 ; Shahina *et al.*, 2024).

Le cinnamaldéhyde, aldéhyde aromatique majoritaire des HEs de cannelle, est également reconnu pour ses propriétés antifongiques. Son mécanisme d'action implique des perturbations membranaires. Des études ont montré que le cinnamaldéhyde induit une augmentation de la conductivité extracellulaire, confirmant ainsi son impact sur les membranes (Zhou *et al.*, 2024 ; OuYang *et al.*, 2019).

Ainsi, bien que leurs fonctions chimiques principales diffèrent, le carvacrol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde présentent tous une structure aromatique substituée, en plus d'un caractère phénolique. Ce socle chimique commun permet d'expliquer le mode d'action partagé observé par conductimétrie, caractérisé par une perméabilisation membranaire et une fuite ionique.

6.4. Quantification du stress oxydatif causé par les HEs sur les (zoo)spores de *P. infestans*

Les résultats obtenus par détection de la fluorescence de la sonde DCFH-DA montrent que les HEs testées sont capables d'induire une production accrue de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) chez *P. infestans*, en particulier à des concentrations proches ou supérieures à $0,025\ \mu\text{L}/\text{mL}$ (demi-MIC). Cette augmentation du signal fluorescent est observée pour l'ensemble des HEs étudiées, bien que son intensité varie selon la nature de l'HE et la concentration appliquée.

L'augmentation progressive de la production de ROS observée entre les différentes concentrations en HE montre une tendance dose-dépendante. Ce phénomène est partagé avec des études montrant que les HEs et leurs composés majoritaires induisent un stress oxydatif croissant lorsque leur concentration augmente (Bakkali *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'HE de cannelle induit une production de ROS plus marquée que celle de clou de girofle aux concentrations inférieures à la MIC, les profils de fluorescence observés à la demi-MIC

(0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$) se rapprochant de ceux du témoin positif. Cette différence ne semble pas uniquement liée à une perturbation de l'intégrité membranaire, également décrite pour l'eugénol, mais pourrait s'expliquer par la forte réactivité chimique du cinnamaldéhyde. En raison de son groupement aldéhyde α,β -insaturé, le cinnamaldéhyde est capable d'interagir de manière covalente avec des cibles cellulaires et de perturber directement l'homéostasie des processus d'oxydoréduction, favorisant ainsi une induction accrue de stress oxydatif (Shreaz *et al.*, 2016).

Les résultats obtenus lors de l'étude de l'impact des HEs sur la production de ROS chez *P. infestans* s'inscrivent dans la continuité de ceux obtenus lors des expériences de conductimétrie. L'augmentation de la conductivité du milieu extracellulaire observée en présence des HEs suggère une altération de l'intégrité de la membrane plasmique, entraînant des fuites ioniques. Une telle perturbation membranaire est susceptible d'affecter les fonctions mitochondriales et de favoriser une production accrue de ROS intracellulaires, comme cela a été largement décrit chez les micro-organismes exposés à des agents membranotropes (Lambert *et al.*, 2001 ; Hyldgaard *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, la production de ROS observée ne constitue probablement pas un mécanisme isolé mais plutôt une conséquence indirecte de la perturbation membranaire, menant à un déséquilibre des flux ioniques et à une altération des systèmes antioxydants cellulaires.

L'HE d'origan présente un profil particulier, avec une augmentation significative de la production de ROS à partir de demi-MIC (0,025 $\mu\text{L}/\text{mL}$), tandis que les concentrations plus faibles (0,0125 $\mu\text{L}/\text{mL}$) ne diffèrent pas du témoin négatif. Ce comportement est compatible avec les propriétés du carvacrol, principal composé de cette HE, connu pour sa capacité à perturber l'intégrité de la membrane plasmique. Bien que les composés phénoliques soient classiquement décrits comme des antioxydants en raison de leur aptitude à stabiliser des électrons non appariés par résonance aromatique, leur effet dépend fortement du contexte cellulaire et des conditions réactionnelles. Dans le cas du carvacrol, la désorganisation de la bicouche lipidique pourrait favoriser l'entrée d'oxygène et de protons dans la cellule, entraînant une perturbation de l'homéostasie redox et une production accrue de ROS à des concentrations sub-inhibitrices (Ultee *et al.*, 2002).

Ainsi, l'induction des ROS par l'HE d'origan apparaît étroitement liée à un seuil de concentration au-delà duquel l'intégrité membranaire est suffisamment compromise pour déclencher un stress oxydatif mesurable.

Il convient toutefois de souligner que l'étude de la fluorescence avec la sonde DCFH-DA permet une évaluation globale du stress oxydatif, sans distinction entre les différentes espèces réactives produites. De plus, la variabilité observée pour certaines conditions, notamment aux

concentrations les plus élevées, suggère que l'induction des ROS dépend fortement de l'état physiologique des spores (qui peut varier selon plusieurs facteurs : stress, température, milieu d'incubation, centrifugation excessive) et de la dynamique d'exposition aux HEs.

Malgré ces limites, les tendances observées sont robustes et concordantes avec les résultats MIC et de conductimétrie, renforçant l'hypothèse selon laquelle l'activité anti-oomycètes des HEs repose sur une combinaison d'altération membranaire et de stress oxydatif plutôt que sur un mécanisme unique.

Bien que les approches par conductimétrie et par détection des espèces réactives de l'oxygène aient permis de mettre en évidence une altération de l'intégrité membranaire et l'induction d'un stress oxydatif chez *P. infestans*, ces méthodes restent indirectes et ne permettent pas de distinguer la contribution précise de chaque molécule constitutive des HEs. En particulier, elles ne renseignent pas sur la dynamique de pénétration intracellulaire des composés ni sur leur distribution au sein des compartiments cellulaires, éléments pourtant déterminants pour relier l'intensité des réponses biologiques observées à des cibles cellulaires spécifiques. Dans ce contexte, l'étude de la cinétique de pénétration du carvacrol, de l'eugénol et du cinnamaldéhyde apparaît comme une étape complémentaire essentielle afin d'établir un lien direct entre la composition chimique des HEs, leur accumulation cellulaire et les effets biologiques mesurés.

6.5. Dynamique de pénétration des composés majoritaires des HEs

L'étude de la dynamique de pénétration a pour objectif de déterminer la localisation préférentielle des HEs par la quantification de leurs composés majoritaires au sein des différentes structures cellulaires de *P. infestans*. Ce protocole s'appuie sur la sélection des HEs les plus prometteuses contre l'oomycète et complètent les premiers modes d'action mis en lumière par la conductimétrie et la quantification des ROS. Cette approche repose sur une analyse à un temps unique, fournissant une image instantanée de la répartition relative des composés entre les différents compartiments cellulaires.

6.5.1. Répartition préférentielle aux structures périphériques

L'analyse de la distribution des composés au sein des compartiments cellulaires met en évidence une association préférentielle avec la fraction intracellulaire, suivie par une interaction modérée avec la paroi, tandis que la fraction associée à la membrane reste quantitativement limitée. Ce profil suggère que, dans les conditions expérimentales étudiées, la pénétration intracellulaire des composés majoritaires demeure partielle et ne constitue pas le seul mécanisme de leur activité anti-oomycètes.

Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature pour des composés issus d'HEs, dont l'activité antimicrobienne repose principalement sur des interactions avec les structures périphériques de la cellule, en particulier la paroi et la membrane, sans nécessité d'une accumulation intracellulaire massive (Hyldgaard *et al.*, 2012 ; Nazzaro *et al.*, 2013). Ces interactions sont suffisantes pour perturber l'homéostasie cellulaire et induire une inhibition de la croissance.

6.5.2. Répartition des composés dominée par la nature du compartiment cellulaire

L'analyse de la variance met en évidence un effet majeur du compartiment cellulaire sur la répartition relative des composés ainsi qu'un effet plus modéré mais significatif de la nature chimique du composé, sans interaction globale significative entre ces deux facteurs. Ces résultats indiquent que la localisation des composés est principalement gouvernée par les contraintes associées aux compartiments cellulaires, tandis que les différences de structure chimique modulent cette répartition de manière plus limitée. Cette observation est d'autant plus cohérente que les composés étudiés présentent des polarités relativement proches. Ceci limite l'impact des différences de structures et renforce le rôle dominant des contraintes dues aux différents compartiments cellulaires

L'analyse de Tukey révèle toutefois une différence significative localisée au niveau de la paroi cellulaire, à l'endroit où le carvacrol présente une proportion significativement plus élevée que le cinnamaldéhyde et l'eugénol. Cette observation suggère une association préférentielle du carvacrol avec la paroi, sans pour autant traduire un changement global du comportement relatif des composés entre compartiments.

L'absence de différences marquées dans les autres compartiments ne doit pas être interprétée comme une limitation expérimentale mais plutôt comme un résultat indiquant que, malgré leurs différences de structures chimiques, les composés étudiés présentent un comportement globalement comparable en termes de répartition cellulaire. Cette similarité de comportement peut notamment s'expliquer par la proximité de leurs propriétés physico-chimiques, ces molécules appartenant toutes à la famille des composés aromatiques hydrophobes et présentant des structures relativement proches, susceptibles d'engendrer des interactions comparables avec les constituants cellulaires.

Ce constat soutient l'hypothèse selon laquelle l'activité anti-oomycète des HEs vis-à-vis de *P. infestans* ne dépend pas exclusivement de la pénétration intracellulaire des composés, mais résulte plutôt de leur capacité à interagir avec l'ensemble des structures cellulaires, entraînant des perturbations fonctionnelles rapides et multiples.

La différence significative observée pour le carvacrol dans la fraction correspondant à la paroi cellulaire constitue un résultat particulièrement intéressant. Chez les oomycètes, dont *P. infestans*, la paroi cellulaire est principalement constituée de polysaccharides tels que la cellulose et les β -glucanes, associés à des protéines pariétales, et se distingue ainsi de la paroi des champignons véritables par l'absence ou la très faible proportion de chitine (Latijnhouwers *et al.*, 2003 ; Mélida *et al.*, 2013). Le carvacrol, monoterpène phénolique, possède un groupement hydroxyle susceptible d'établir des interactions hydrogène avec ces polysaccharides et protéines pariétales. Cette propriété physico-chimique pourrait ainsi expliquer son association plus marquée à la fraction pariétale par rapport à l'eugénol et au cinnamaldéhyde, dont les structures présentent un potentiel d'interaction différent avec les composants de la paroi cellulaire. Ce comportement est partagé dans des études antérieures montrant que le carvacrol présente une forte affinité pour les structures périphériques des cellules microbiennes (Ultee *et al.*, 2002 ; Lambert *et al.*, 2001). L'association privilégiée du carvacrol à la paroi pourrait ainsi constituer une étape préliminaire à l'altération des membranes sous-jacentes.

6.5.3. Lien entre propriétés anti-oomycètes et les autres résultats expérimentaux

Les résultats de pénétration obtenus s'intègrent de manière cohérente avec l'ensemble des différentes observations issues des expériences de détermination des MIC, de conductimétrie et de production de ROS. L'absence de pénétration intracellulaire massive des composés majoritaires des HEs (>50%) est compatible avec une activité anti-oomycètes principalement fongistatique aux concentrations proches de la MIC, comme démontré par les essais d'inhibition de la croissance du mycélium.

Plusieurs travaux ont démontré que l'activité antimicrobienne des HEs repose majoritairement sur une perméabilisation des membranes ainsi qu'une perturbation de l'homéostasie cellulaire. Ces perturbations sont causées par des interactions moléculaires locales plutôt que par une accumulation intracellulaire élevée des composés bioactifs (Burt, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2008). Les résultats obtenus au cours de ce travail soutiennent cette hypothèse en démontrant qu'une interaction limitée mais ciblée avec les structures cellulaires périphériques est suffisante pour induire des déséquilibres ioniques, un stress oxydatif et une inhibition de la croissance mycélienne.

7. CONCLUSION

Ce travail de fin d'études avait pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes et sites d'action anti-oomycètes des HEs sur *P. infestans*, agent responsable du mildiou de la pomme de terre, en mettant l'accent sur l'identification de leurs sites et modes d'action à l'échelle cellulaire.

Dans un premier temps, l'évaluation *in vitro* de l'activité de six HEs contre *P. infestans* a mis en évidence des différences marquées d'activités anti-oomycètes selon leur composition chimique. Les HEs d'origan, de cannelle (de Chine et de Ceylan) et de clou de girofle se sont distinguées par une inhibition significative de la croissance mycélienne de *P. infestans*, contrairement aux HEs de bergamote et de romarin, dont l'activité inhibitrice s'est révélée plus limitée. Ces résultats confirment le rôle central du chémotype et de la nature des composés majoritaires dans l'efficacité biologique des HEs.

La détermination des concentrations minimales inhibitrices a révélé une corrélation étroite entre l'activité anti-oomycète observée et la présence de composés phénoliques ou aldéhydiques tels que le carvacrol, l'eugénol et le cinnamaldéhyde. Les essais réalisés à l'aide d'extraits enrichis en composés majoritaires ont confirmé leur contribution prépondérante à l'activité biologique, tout en suggérant que les HEs naturelles pourraient bénéficier d'interactions entre composés majoritaires et minoritaires.

Les analyses de conductimétrie ont montré que les HEs les plus actives induisent une augmentation rapide et concentration-dépendante de la perméabilité membranaire du mycélium de *P. infestans*. Ces fuites électrolytiques traduisent une altération précoce de l'intégrité de la membrane plasmique, suggérant que celle-ci constitue une cible majeure des HEs. Ces observations sont cohérentes avec les données de la littérature et soutiennent l'hypothèse d'un mécanisme d'action reposant sur la désorganisation membranaire et le stress osmotique.

Par ailleurs, l'étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène a mis en évidence une induction variable du stress oxydatif selon la nature de l'HE testée. Les HEs de cannelle de Chine et de clou de girofle ont provoqué une augmentation significative de la production de ROS, tandis que l'HE d'origan a induit une réponse plus modérée. Ces résultats indiquent que le stress oxydatif constitue un mécanisme d'action complémentaire dont l'intensité dépend à la fois de la concentration et du profil chimique des HEs.

L'étude de la dynamique de pénétration des composés majoritaires des HEs met en évidence le fait que leur répartition cellulaire est principalement déterminée par la nature des compartiments biologiques, tandis que la structure chimique des molécules n'exerce qu'un effet modulateur plus

limité. L'absence d'interaction globale significative entre le composé et le compartiment suggère que les contraintes imposées par les différentes structures cellulaires s'exercent de manière comparable sur l'ensemble des composés étudiés. Une différence localisée est toutefois observée au niveau de la paroi cellulaire, où le carvacrol présente une association préférentielle. Ces résultats indiquent que l'activité anti-oomycète des HEs vis-à-vis de *P. infestans* ne repose pas uniquement sur une pénétration intracellulaire mais implique des interactions multiples avec les structures cellulaires, susceptibles d'induire des perturbations fonctionnelles rapides.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus montrent que les HEs exercent une pression multicible sur *P. infestans*, combinant perturbations membranaires, stress oxydatif et interactions avec les structures cellulaires. Cette multiplicité de cibles constitue un atout potentiel face aux problématiques de résistance observées avec les fongicides conventionnels. Ce travail contribue ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans l'activité anti-oomycète des HEs et renforce leur intérêt comme alternatives ou compléments aux stratégies de lutte actuelle contre le mildiou de la pomme de terre.

8. PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action anti-oomycètes des HEs sur *P. infestans*, en particulier au niveau des interactions avec les structures cellulaires et des réponses physiologiques induites. Ils ouvrent ainsi diverses perspectives de recherche visant à approfondir ces observations et à en renforcer la portée scientifique et appliquée.

Une première perspective concerne l'affinement des approches expérimentales utilisées pour caractériser les réponses cellulaires, notamment en ce qui concerne l'étude du stress oxydatif. La méthode employée dans ce travail a permis de mettre en évidence une induction de ROS dépendante de la nature des HEs. Cependant, des approches complémentaires permettraient de mieux discriminer les mécanismes impliqués comme l'utilisation de sondes plus spécifiques où la mesure directe de marqueurs de dommages oxydatifs et de l'activité des systèmes antioxydants endogènes offriraient une vision plus précise du rôle du stress oxydatif dans l'activité anti-oomycète observée.

Une seconde perspective réside dans l'approfondissement de l'étude des interactions entre les HEs et les structures cellulaires périphériques. Les résultats obtenus suggèrent que l'activité biologique des HEs ne repose pas uniquement sur une pénétration intracellulaire mais implique des interactions multiples avec la paroi cellulaire et la membrane plasmique. Des techniques de microscopie avancées ou des approches spectroscopiques pourraient permettre de visualiser et

de caractériser plus finement ces interactions ainsi que les altérations structurales induites au niveau des barrières cellulaires.

Par ailleurs, l'étude des effets combinés des différents constituants des HEs constitue une perspective importante. La comparaison entre HEs naturelles et composés majoritaires isolés suggère que des interactions entre composés pourraient contribuer à l'activité anti-oomycète observée. L'évaluation systématique d'effets synergiques ou antagonistes, à l'aide de mélanges reconstitués, permettrait de mieux comprendre l'origine de cette activité multicible et d'optimiser la composition de formulations potentielles.

Enfin, l'extension de ces travaux vers des systèmes biologiques plus complexes représente une étape clé pour envisager une application agronomique. Des essais menés sur d'autres stades du cycle de vie de *P. infestans*, ainsi que sur tissus végétaux ou en conditions semi-contrôlées, permettraient d'évaluer la pertinence biologique des mécanismes mis en évidence *in vitro*. Ces études seraient indispensables pour juger du potentiel des HEs comme alternatives ou compléments aux stratégies de lutte chimique conventionnelles, dans une optique de gestion durable du mildiou de la pomme de terre.

9. ANNEXES

Annexe 1 : Composition détaillée de l'HE de cannelle de chine après analyse GCMS.

Cannelle de chine							
Composé	% Relatif	Ecart-type	RI	RI lit	Différence %	CAS	Fonction organique
(E)-cinnamaldéhyde	67,76	1,01	2011	2032	1,03	104-55-2	Aldéhyde
Métoxy-cinnamaldéhyde	14,94	1,31	2399	2430	1,28	1504-74-1	Aldéhyde
Acétate de cinnamyle	5,4	0,32	2118	2145	1,26	103-54-8	Ester
Benzaldéhyde	3,2	0,3	1501	1508	0,46	100-52-7	Aldéhyde
2-méthoxybenzaldéhyde	1,31	0,19	1929	1941	0,62	135-02-4	Aldéhyde
Alcool phényléthylrique	1,26	0,08	1863	1896	1,74	104-55-2	Alcool
Benzènepropanal	1,15	0,1	1753	1783	1,68	36231-13-7	Aldéhyde
(Z)-cinnamaldéhyde	1,15	0,08	1880	1870	-0,53	60-12-8	Aldéhyde
β -isopropyltropolone	1,36	0,11	2049	2028	-1,04	499-44-5	Cétone
Non-identifié	2,47		-	-	-	-	-

Annexe 2 : Composition détaillée de l'HE de clou de girofle après analyse GCMS.

Clou de Girofle							
Composé	% Relatif	Ecart-type	RI	RI lit	Différence %	CAS	Fonction organique
Eugénol	63,03	0,68	2132	2161	1,34	97-53-0	Ether
Acétate d'eugényle	24,46	0,07	2227	2252	1,11	93-28-7	Ester
β -caryophyllène	7,90	0,08	1579	1570	-0,57	87-44-5	Alcène
Humulène	2,07	0,47	1648	1646	-0,12	6753-98-6	Alcène
Non-identifié	2,54	-	-	-	-	-	-

Annexe 3 : Composition détaillée de l'HE de Romarin après analyse GCMS.

Romarin							
Composé	% Relatif	Ecart-type	RI	RI lit	Différence %	CAS	Fonction organique
Eucalyptol	21,32	0,05	1199	1211	0,99	470-82-6	Éther
Camphre	19,93	0,10	1496	1509	0,86	464-49-3	Cétone
α -pinène	13,97	0,05	1035	1050	1,43	80-56-8	Alcène
Camphène	9,29	0,04	1065	1075	0,93	79-92-5	Alcène
Isobornéol	7,42	0,03	1677	1642	-2,13	124-76-5	Alcool
(S)-limonène	5,39	0,02	1189	1193	0,34	5989-54-8	Alcène
β -myrcène	4,00	0,02	1155	1145	-0,87	123-35-3	Alcène
β -pinène	3,30	0,02	1098	1110	1,08	127-91-3	Alcène
p-cymène	2,78	0,01	1257	1272	1,18	99-87-6	Alcène
β -caryophyllène	2,56	0,01	1577	1570	0,13	87-44-5	Alcène
Acétate de bornyle	1,65	0,03	1561	1571	0,64	76-49-3	Ester
Terpinène-4-ol	1,05	0,12	1583	1590	0,44	562-74-3	Alcool
Linalol	0,84	0,05	1533	1560	1,73	78-70-6	Alcool
γ -terpinène	0,75	0,08	1234	1235	0,08	99-85-4	Alcène
Humulène	0,68	0,06	1648	1646	-0,12	6753-98-6	Alcène
Tricyclène	0,56	0,08	1022	1022	0,00	508-32-7	Alcène
Delta-3-carène	0,43	0,00	1137	1142	0,44	13466-78-9	Alcène
(+)-4-carène	0,42	0,00	1168	1158	-0,86	586-62-9	Alcène
Terpinolène	0,39	0,01	1270	1263	-0,55	29050-33-7	Alcène
Sabinène	0,32	0,01	1113	1117	0,36	36262-09-6	Alcène
Non-identifié	2,96	-	-	-	-	-	-

Annexe 4 : Composition détaillée de l'HE d'origan après analyse GCMS.

Origan							
Composé	% Relatif	Ecart-type	RI	RI lit	Différence %	CAS	Fonction organique
Carvacrol	50,69	1,13	2180	2219	1,76	499-75-2	Phénol
p-cymène	10,55	0,20	1260	1272	0,94	99-87-6	Alcène
γ -terpinène	8,05	0,04	1236	1235	-0,08	99-85-4	Alcène
Thymol	7,09	0,08	2154	2164	0,46	89-83-8	Phénol
β -caryophyllène	6,79	0,02	1579	1570	-0,57	87-44-5	Alcène
Linalol	5,12	0,03	1156	1164	0,69	78-70-6	Alcool
β -myrcène	3,12	0,05	1534	1560	1,67	123-35-3	Alcène
α -pinène	2,46	0,36	1032	1050	1,71	80-56-8	Alcène
Terpinène-4-ol	1,04	0,04	1585	1590	0,31	562-74-3	Alcool
(+)-4-carène	2,40	0,01	1168	1158	-0,86	29050-33-7	Alcène
Non-identifié	2,69	-	-	-	-	-	-

Annexe 5 : Composition détaillée de l'HE de cannelle de Ceylan après analyse GCMS.

Cannelle de Ceylan							
Composé	% Relatif	Ecart-type	RI	RI lit	Différence %	CAS	Fonction organique
(E)-cinnamaldéhyde	50,69	1,65	2011	2032	1,03	14371-10-9	Aldéhyde
β -caryophyllène	10,55	0,12	1581	1570	-0,70	87-44-5	Alcène
Eugénol	8,05	0,13	2132	2161	1,34	97-53-0	Phénol
Linalol	7,09	0,02	1535	1560	1,60	78-70-6	Alcool
Acétate de cinnamyle	6,79	0,03	1259	1270	0,87	103-54-8	Ester
p-cymène	5,12	0,12	2119	2153	1,58	99-87-6	Alcène
α -phéllandrène	4,13	0,02	1165	1157	-0,69	99-83-2	Alcène
Eucalyptol	3,12	0,19	1199	1210	0,91	470-82-6	Éther
α -pinène	1,48	0,72	1033	1050	1,62	80-56-8	Alcène
Non-identifié	2,99	-	-	-	-	-	-

Annexe 6 : Composition détaillée de l'HE de Bergamote après analyse GCMS.

Bergamote							
Composé	% Relatif	Ecart-type	RI	RI lit	Différence %	CAS	Fonction organique
D-limonène	30,36	0,05	1196	1206	0,83	138-86-3	Alcène
Acétate de linalyle	28,76	0,20	1551	1548	-0,19	115-95-7	Ester
Linalol	16,63	0,02	1537	1560	1,47	78-70-6	Alcool
β -pinène	7,63	0,02	1099	1110	0,99	127-91-3	Alcène
γ -terpinène	7,04	0,00	1237	1235	-0,16	99-85-4	Alcène
β -myrcène	4,57	0,11	1156	1164	0,69	123-35-3	Alcène
Acétate de néryle	1,14	0,00	1708	1717	0,52	141-12-8	Ester
p-cymène	1,11	0,03	1258	1272	1,10	99-87-6	Alcène
Non-identifié	2,76		-	-	-	-	-

Annexe 7 : Diamètres des différents génotypes de *P. infestans* (après 7 jours de développement ; n=3) en présence d'HEs naturelles et d'HEs enrichies afin d'étudier les effets des composés majoritaires. Les cases grisées correspondent à une inhibition complète de la croissance mycélienne

EU-37		Mesure en cm				
Concentration (µL/mL)	Origan	Clou de girofle	Cannelle de Ceylan	Carvacrol (enrichi)	EugénoL (enrichi)	Cinnamaldéhyde (enrichi)
0,1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
0,05	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	5.0 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.1 ± 0.2
0,025	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.0	2.4 ± 0.4	0.5 ± 0.0	1.0 ± 0.0	3.4 ± 0.4
0,0125	2.0 ± 0.1	2.8 ± 0.5	3.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.0	3.7 ± 0.4

EU-36		Mesure en cm				
Concentration (µL/mL)	Origan	Clou de girofle	Cannelle de Ceylan	Carvacrol (enrichi)	EugénoL (enrichi)	Cinnamaldéhyde (enrichi)
0,1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
0,05	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
0,025	1.2 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.7 ± 0.5	1.4 ± 0.1
0,0125	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.5	1.2 ± 0.1	2.7 ± 0.8	2.0 ± 0.3

EU-13		Mesure en cm				
Concentration (µL/mL)	Origan	Clou de girofle	Cannelle de Ceylan	Carvacrol (enrichi)	EugénoL (enrichi)	Cinnamaldéhyde (enrichi)
0,1	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
0,05	0.5 ± 0.0	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
0,025	1.5 ± 0.0	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
0,0125	1.8 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.9 ± 0.4	1.6 ± 0.0	2.2 ± 0.2	3.5 ± 0.5

Annexe 8 : Données et équations des courbes de calibrage utilisées pour la quantification dans la dynamique de pénétration.

	Isopropanol - Cinnamaldéhyde	Isopropanol - Carvacrol	Isopropanol - EugénoL
µL/mL	Aire		
0,67	361237471,4	267130323,3	387316857
0,134	115455820,1	87183541,9	72746655,8
0,067	70098735,6	58239648	47652959,2
0,0335	27070553,5	32223248	26749675,2
Équation	$y=6 \cdot 10^8$	$y=6 \cdot 10^8$	$y=6 \cdot 10^8$
R carré	0,9882	0,9715	0,9894

	Hexane - Cinnamaldéhyde	Hexane - Carvacrol	Hexane - EugénoL
µL/mL	Aire		
0,67	331482166,1	296081136,3	372977764
0,134	100839941,3	98924762,7	76362644,9
0,067	61350298,3	63768101,1	48512640,8
0,0335	28634762,9	36036285,1	23980335,6
Équation	$y=5 \cdot 10^8$	$y=6 \cdot 10^8$	$y=6 \cdot 10^8$
R carré	0,9816	0,9794	0,9863

Annexe 9 : Liste des ions recherchés par composé majoritaire dans l'analyse GCMS (SIM)

SIM	m/z	
Carvacrol	150	91
	136	78
	135	77
Eugénol	164	103
	149	91
	137	77
	131	55
Cinnamaldéhyde	132	103
	131	78
	104	77
	103	51

10. BIBLIOGRAPHIE

1. Abad, Z. G., Scanu, B., Cooke, D. E. L., & Brasier, C. M. (2023). *Phytophthora: Taxonomic and phylogenetic revision of the genus*. *Studies in Mycology*, 106, 259–348.
2. Aykut Tonk, F., Yüce, S., Bayram, E., Giachino, R., Sonmez, C., Telci, I., & Furan, A. (2010). Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. *Plant Systematics and Evolution*, 288, 157–165.
3. Bajpai, V. K., Sharma, A., & Baek, K. H. (2012). Antibacterial mode of action of *Cinnamomum cassia* essential oil against *Burkholderia glumae*. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 1194–1203.
4. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
5. Bartnicki-García, S., & Wang, M. C. (2013). Analysis of hyphal morphogenesis in oomycetes by microscopy and fluorochrome staining. *Mycological Research*, 117(4), 289–302.
6. Beakes, G. W., Glockling, S. L., & Sekimoto, S. (2012). The evolutionary phylogeny of the oomycete fungi. *Protoplasma*, 249(1), 3–19.
7. Beals, K. A. (2018). A review of potatoes and their role in global health.
8. Birch, P. R. J., Bryan, G., Fenton, B., Gilroy, E. M., Hein, I., Jones, J. T., Prashar, A., Taylor, M. A., Torrance, L., & Toth, I. K. (2012). Crops that feed the world 8: Potato—Are the trends of increased global production sustainable? *Food Security*, 4(4), 477–508.
9. Boevink, P. C., Wang, X., McLellan, H., He, Q., Naqvi, S., Armstrong, M., ... Birch, P. R. J. (2020). *Phytophthora infestans* effector AVR3a associates with dynamin-related protein 2 required for endocytosis of the plant immune receptor RXLR. *New Phytologist*, 225(2), 578–594.
10. Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., & Bessière, J.-M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 481–484.
11. Brasier, C. M. (2009). *Phytophthora biodiversity: How many Phytophthora species are there?* In E. M. Goheen & S. J. Frankel (Eds.), *Phytophthoras in forests and natural ecosystems* (pp. 101–115). USDA Forest Service.
12. Brasier, C. M., Scanu, B., Cooke, D. E. L., Jung, T., McCarthy, H., & Bourret, T. B. (2022). *Phytophthora*: An ancient, historic, biologically and structurally cohesive and evolutionarily successful generic concept in need of preservation. *IMA Fungus*, 13, Article 12.
13. Bubolz, J., Sleboda, P., Lehrman, A., Hansson, S.-O., Lagerkvist, C. J., Andersson, B., ... Andreasson, E. (2022). Genetically modified late blight-resistant potato and consumer attitudes before and after a field visit. *GM Crops & Food*, 13(1), 290–298.

14. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
15. CABI. (2024). Global impact and management of bacterial wilt in potatoes. CABI.
16. Chang, S. T., Chen, P. F., & Chang, S. C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 123–127.
17. Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G. J. E., & Haroutounian, S. A. (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8261–8267.
18. Cooke, D. E. L., Cano, L. M., Raffaele, S., Bain, R. A., Cooke, L. R., Etherington, G. J., ... Kamoun, S. (2012). Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathogens*, 8(10), e1002940.
19. Cooke, L. R., Schepers, H. T. A. M., Hermansen, A., Bain, R. A., Bradshaw, N. J., Ritchie, F., ... Kessel, G. J. T. (2011). Epidemiology and integrated control of potato late blight in Europe. *Potato Research*, 54(2), 183–222.
20. Cordeiro, K., Scaffo, J., Flexa, B., Gama, C., Ferreira, M., Cruz, R., ... Fernandes, C. (2023). Characterization of bergamot essential oil: Chemical, microbiological and colloidal aspects. *Brazilian Journal of Biology*, 83.
21. da Silva, A. C., Lopes, P. M., de Azevedo, M. M. B., Costa, D. C., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2019). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 24(4), 759.
22. de Oliveira, J. R., de Jesus, D., Bizzo, H. R., de Souza, L. R. R., Martins, C. H. G., & de Almeida, R. (2020). Essential oils: A review of their antifungal activities and potential application. *Molecules*, 25(9), 2246.
23. Demirci, F., Paper, D. H., Franz, G., & Başer, K. H. C. (2017). Chemical composition and biological activities of clove essential oil. *Natural Product Communications*, 12(3), 381–384.
24. Dong, S., & Zhou, S. (2022). Potato late blight caused by *Phytophthora infestans*: From molecular interactions to integrated management strategies. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(12), 3456–3466.
25. Dupuis, B., Schüpbach-Regula, G., & Frossard, E. (2024). Economic impact of Potato virus Y in European seed potato production. *European Journal of Plant Pathology*, 160(2), 375–388.
26. Fawke, S., Doumane, M., & Schornack, S. (2015). Oomycete interactions with plants: Infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 263–280.
27. Fry, W. E. (2008). *Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 385–402.

28. Fry, W. E., Birch, P. R. J., Judelson, H. S., Grünwald, N. J., Danies, G., Everts, K. L., ... Smart, C. D. (2015). Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. *Phytopathology*, 105(7), 966–981.
29. Gallegly, M. E., & Hong, C. (2008). *Phytophthora: Identifying species by morphology and DNA fingerprints*. APS Press.
30. Gisi, U., & Cohen, Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 549–572.
31. Gisi, U., Waldner, M., Kraus, N., Dubuis, P. H., Sierotzki, H., & Shattock, R. (2011). Mechanisms influencing the evolution of resistance to QoI fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 197–208.
32. Grenville-Briggs, L. J., Anderson, V. L., Fugelstad, J., Avrova, A. O., Bouzenzana, J., Williams, A., & Bruce, C. R. (2008). Cell wall structure and development in *Phytophthora infestans*. *Fungal Biology Reviews*, 22(3), 113–128.
33. Grünwald, N. J., & Flier, W. G. (2005). The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 171–190.
34. Hahn, M., Rehfus, A., & Starke, J. (2021). Mutations in cellulose synthase gene *PiCesA3* confer resistance to CAA fungicides in *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, 105(9), 2929–2937.
35. Haverkort, A. J., Struik, P. C., Visser, R. G. F., & Jacobsen, E. (2016). Applied biotechnology to combat late blight in potato. *Potato Research*, 59(1), 35–52.
36. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: Mode of action and interactions. *Frontiers in Microbiology*, 3, Article 12.
37. International Potato Center. (2024). *Potato facts and figures*.
38. Ivanov, A. A., Ukladov, E. O., & Golubeva, T. S. (2021). *Phytophthora infestans*: An overview of methods to combat late blight. *Journal of Fungi*, 7(12), 1071.
39. Ivanović, Ž., Stanisavljević, D., Milošević, D., Bagi, F., & Jović, J. (2022). Diversity and pathogenicity of *Alternaria* species causing early blight on potato and tomato in Serbia. *Plant Pathology*, 71(4), 731–743.
40. Jennings, S. A., Koehler, A.-K., Nicklin, K. J., Deva, C., Sait, S. M., & Challinor, A. J. (2020). Global potato yields increase under climate change with adaptation and CO₂ fertilisation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, Article 519.
41. Judelson, H. S., & Blanco, F. A. (2005). The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 47–58.
42. Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D. G., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., ... Zhan, J. (2015). The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413–434.

43. Kennedy, G., Burlingame, B., & Nguyen, V. N. (2019). *Nutritional contribution of potatoes to diets in the world*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
44. Knauth, P., López, Z. L., Acevedo-Hernandez, G., & Sevilla, M. T. E. (2018). Cinnamon essential oil: Chemical composition and biological activities. In *Essential oils: Production, applications and health benefits* (pp. 215–244).
45. Kwon, S., Park, J., & Hahn, M. (2021). Cytological and molecular mechanisms of appressorium-mediated host penetration by *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*, 12, Article 700123.
46. Latijnhouwers, M., de Wit, P. J. G. M., & Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: Similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology*, 11(10), 462–469.
47. Latijnhouwers, M., Govers, F., & Munnik, T. (2003). *Phytophthora infestans* requires phospholipase D for appressorium formation. *Molecular Microbiology*, 47(4), 939–950.
48. Lebeau, J., Maillard, M., & Dumas, B. (2022). Visualization of oomycete infection structures using fluorescent lectins and confocal microscopy. *Plant Pathology*, 71(2), 303–314.
49. Lebreton, L., Andrivon, D., & Pellé, R. (2019). Environmental factors influencing the sporulation and infection processes of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, 68(3), 489–499.
50. Leesutthiphonchai, W., Vu, A. L., Ah-Fong, A. M. V., & Judelson, H. S. (2018). How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? *Phytopathology*, 108(8), 916–924.
51. Li, H., Yang, X., & Liu, T. (2024). Population genetics of *Alternaria solani* and implications for disease management in potato production. *Frontiers in Plant Science*, 15, Article 1398452.
52. Liu, X., Chen, S., Chen, Q., Zhu, J., & Wang, Y. (2020). Resistance risk of *Phytophthora infestans* to oxathiapiprolin: Inheritance, stability, and fitness costs. *Plant Disease*, 104(12), 3141–3148.
53. Liu, Y., Zhang, X., Wang, L., Chen, H., & Xu, F. (2023). Anti-oomycete activities of essential oils and their major components against *Phytophthora infestans*. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 71345–71357.
54. Madoui, M. A., Gaulin, E., Mathé, C., & Bottin, A. (2009). Sterol uptake and regulation in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 347–359.
55. Martini, F., Dupont, J., & Beuchat, A. (2022). Antifungal and anti-oomycete potential of essential oils against potato pathogens: A comprehensive review. *Plant Pathology*, 71(4), 789–805.
56. Martini, F., Gontier, E., Jijakli, M. H., Muchembled, J., & Fauconnier, M.-L. (2023). Harnessing plant's arsenal: Essential oils as promising tools for sustainable management of potato late blight disease caused by *Phytophthora infestans*. *Molecules*, 28(21), 7302.

57. Mazáková, J., Táborský, V., Zouhar, M., Ryšánek, P., Hausvater, E., & Doležal, P. (2006). Occurrence and distribution of mating types A1 and A2 of *Phytophthora infestans* in the Czech Republic. *Plant Protection Science*, 42(2), 41–48.
58. Meijer, H. J. G., Mancuso, F. M., Espadas, G., Seidl, M. F., Chiva, C., Govers, F., & Vandepoele, K. (2014). Profiling the secretome and membrane proteins of *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 15(8), 761–775.
59. Mélida, H., Sandoval-Sierra, J. V., Diéguez-Uribeondo, J., & Bulone, V. (2013). Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types. *Eukaryotic Cell*, 12(12), 194–203.
60. Miao, J., Dong, X., Lin, D., Wang, Y., & Zhu, X. (2016). Resistance mechanism of *Phytophthora infestans* to the fungicide oxathiapiprolin. *Molecular Plant Pathology*, 17(4), 553–564.
61. Nanda, A. K., Singh, A., & Sharma, N. (2019). FTIR and Raman spectroscopic studies of phytopathogenic oomycetes: Insights into cell wall structure and antifungal targets. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 213, 294–302.
62. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 10(4), Article 86.
63. Noshirvani, N., & Noshirvani, F. (2024). Essential oils as natural food preservatives: Special emphasis on their antimicrobial and antioxidant properties. *Journal of Food Quality*, 2024, Article 1–14.
64. Nowicki, M., Foolad, M. R., Nowakowska, M., & Kozik, E. U. (2012). Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease*, 96(1), 4–17.
65. Ojha, S., Karki, L. B., & Ali, M. (2025). A comprehensive analysis of potato production and trade: Global trends and U.S. production forecasting. *American Journal of Economics and Business Innovation*, 4(2), 42–48.
66. Özer, E., & Koyuncu, I. (2020). *In vitro* antifungal activity of essential oil from *Origanum acutidens* against *Phytophthora infestans*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 44(3), 231–239.
67. Ospankulova, G., Nurlybayeva, A., & Suleimenova, A. (2023). Molecular diversity of Potato virus Y isolates from different regions. *Virology Journal*, 20(1), Article 211.
68. OuYang, Q., Duan, X., Li, L., & Tao, N. (2019). Cinnamaldehyde exerts its antifungal activity by disrupting the cell wall integrity of *Geotrichum citri-aurantii*. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 2777.
69. Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Choi, W. S., Jo, H. J., Chang, J. W., & Choi, I. G. (2007). Antifungal activities of the essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Leptospermum petersonii* against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology*, 45(5), 460–465.

70. Pérez, W., Forbes, G. A., & Fry, W. E. (2021). Survival and dispersal mechanisms of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, 105(5), 1153–1164.
71. Phiri, M., Gondwe, T., & Tembo, Y. (2024). Genomic diversity of *Ralstonia solanacearum* complex and implications for potato production. *Microorganisms*, 12(5), Article 1012.
72. Ranasinghe, P., Pigera, S., Premakumara, S., Galappaththy, P., Constantine, G. R., & Katulanda, P. (2023). Medicinal properties of “true” cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): A systematic review. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23, Article 74.
73. Rezouki, A., Elbouzidi, A., & Bouchra, A. (2021). Chemical composition and antifungal, insecticidal, and antioxidant activities of *Origanum compactum* essential oil from Morocco. *Plants*, 10(4), Article 896.
74. Schepers, H. T. A. M., Kessel, G. J. T., Lucca, F., Förch, M. G., van den Bosch, G. B., Top, S. M., & Evenhuis, A. (2018). Reduced efficacy of fluazinam against *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology*, 150(1), 59–72.
75. Schmey, A., Müller, M. E. H., & Hausladen, H. (2024). Genetic diversity of *Alternaria* species causing early blight in European potato crops. *Frontiers in Plant Science*, 15, Article 1422561.
76. Shahina, Z., & Dahms, T. E. S. (2024). A comparative review of eugenol and citral anticandidal mechanisms: Partners in crimes against fungi. *Molecules*, 29(23), Article 5536.
77. Shattock, R. C. (2002). *Phytophthora infestans*: Populations, pathogenicity and phenylamide resistance. *Mycological Research*, 106(8), 857–865.
78. Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., Raja, V., Irshad, M., Karched, M., ... Siddiqi, W. A. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives: A novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, 112, 116–131.
79. Silva, L. M., Oliveira, M. M., & Fernandes, A. C. (2020). Carvacrol activity against phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 150, Article 112403.
80. Soyulu, E. M., Soyulu, S., & Kurt, Ş. (2006). Antimicrobial activities of essential oils of various plants against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Pathology*, 88(2), 113–118.
81. Tian, Y., Zhang, H., Wang, Y., & Liu, X. (2024). Biocontrol mechanisms of three plant essential oils against *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 114(7), 1234–1243.
82. Torrance, L., Lacomme, C., & Stroud, G. (2020). The role of Potato virus Y in seed potato degeneration: Current status and future prospects. *Plant Pathology*, 69(1), 5–21.
83. Tzortzakis, N. G., & Economakis, C. D. (2007). Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 253–258.
84. Ulanowska, M., & Olas, B. (2021). Biological properties and prospects for the application of eugenol—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), Article 3671.
85. Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20.

86. Wang, J., Zhang, X., & Li, Y. (2023). Diversity and virulence of *Ralstonia solanacearum* strains infecting potato in Asia. *Plant Disease*, 107(1), 102–110.
87. Wang, Y., Feng, K., Yang, H., Zhang, H., & Zhan, J. (2020). Antifungal mechanism of cinnamaldehyde against plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 167, Article 104582.
88. Werrie, P.-Y., Durenne, B., Delaplace, P., & Fauconnier, M.-L. (2020). Phytotoxicity of essential oils: Opportunities and challenges. *Molecules*, 25(9), Article 2041.
89. Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., & Birch, P. R. J. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 450(7166), 115–118.
90. Xue, R. D., Chen, F., Ma, Y., & Liu, J. (2019). Population structure and fungicide resistance of *Alternaria solani* causing early blight of potato in China. *Plant Disease*, 103(7), 1545–1554.
91. Zaheer, K., & Akhtar, M. H. (2016). Potato production, usage, and nutrition—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(5), 711–721.
92. Zhang, J., Ma, S., Du, S., Chen, S., & Sun, H. (2019). Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Science and Technology*, 56(5), 2611–2620.
93. Zhang, X., Yang, S., & Guo, Y. (2019). Antifungal activity of cinnamon essential oil against plant pathogenic fungi. *Crop Protection*, 123, 105–112.
94. Zhou, X., Zhang, Y., Li, X., & Chen, J. (2021). Antimicrobial activity and action mechanism of cinnamaldehyde against phytopathogenic oomycetes. *Plant Disease*, 105(2), 456–464.