

Marion Chabaud  
M2 GQPV  
Fév. à Aout 2009

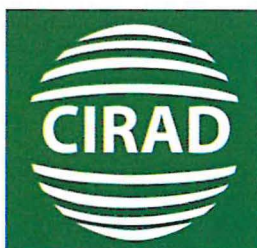


Identification et qualification des composés  
impliqués dans la protection du palmier à huile vis-  
à-vis de la mineuse *Coelaenomenodera lameensis*



Stage effectué au : **CIRAD**- département PERSYST (UMR Qualisud)  
Rue Jean-François BRETON  
34398 Montpellier Cedex 5

Maître de stage et encadrants : **Gilles Morel**  
Pierre Brat  
Jean-Marc Brillouet  
Bruno Nouy  
Laurence Ollivier



CIRAD-DIST  
Unité bibliothèque  
Lavalette



## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier la société PalmElit et tout particulièrement Monsieur Bruno Nouy généticien et investigateur de ce stage sur le palmier à huile

Je remercie également le Cirad et l'équipe Persyst de m'avoir reçu dans leurs locaux afin de mener à bien ce projet en collaboration avec PalmElit et l'équipe Bios Cirad représenté par Laurence Ollivier

Merci à Messieurs gilles Morel (technicien chimiste), Pierre Brat (docteur en recherche), Jean-Marc Brillouet (Directeur de recherche Inra) pour leur aide et leur lumière tout au long de ces 6 mois de stage.

Un grand merci à mon maître de stage Gilles Morel pour son accueil au sein de l'équipe, pour sa patience et sa gentillesse. Merci de m'avoir formé aux différentes techniques HPLC, d'avoir eu confiance en moi en mes capacités et en mon travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé ou soutenu lors de ce stage : Clément, Carine, Adrien, Christian, Joël...

Enfin, je félicite les différentes chaîne HPLC d'avoir été performante à chacune de mes utilisations, de n'être tombée en panne que lorsque je n'avais plus besoin d'elles. Elles ont été de très bonnes collaboratrices.

# Sommaire

Remerciement.....	2
Le CIRAD.....	5
PalmElit.....	8
Abréviations.....	9
I. Introduction.....	10
II. Travaux Antérieurs.....	13
- Le palmier à huile, description botanique.....	13
- <i>Coelaenomenodera lameensis</i> , la mineuse du palmier à huile.....	13
- Relation palmier à huile / mineuse.....	14
- Les polyphénols.....	14
III. Matériels et Méthodes.....	16
A. Matériels.....	16
1. Tableau du matériel végétal analysé.....	16
2. Rappel de génétique.....	18
3. Liste du matériel chimique utilisé.....	18
B. Méthodes.....	19
1. Extraction des polyphénols.....	19
2. Analyse chromatographique.....	19
2.1 Analyse par chromatographie analytique.....	19
2.2 Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.....	19
2.3 HPLC semi-préparative.....	20
3. Hydrolyse.....	20
3.1 Hydrolyse acide.....	20
3.2 Hydrolyse alcaline.....	21
IV. Résultats et discussion.....	22
A. Analyse des profils chromatographique de différents matériels.....	22
1. Analyse du matériel adulte.....	22

1.1 Comparaison des différentes origines d'une même espèce.....	22
a) <i>Elaeis oleifera</i> .....	22
- Origine Amérique centrale.....	23
- Origine Brésil.....	23
- Comparaison Amérique centrale / Brésil.....	24
b) <i>Elaeis guineensis</i> .....	24
1.2 Comparaison des deux espèces Eo et Eg.....	25
1.3 Identification des pics 1 à 8 et a à i.....	26
1.4 Détermination des molécules potentiellement responsable de la résistance à la mineuse.....	27
a) Etablissement des profils chromatographique pour tout le matériel végétal adulte.....	27
b) Recherche par ion sélectif.....	28
c) Aire sous pic.....	29
1.5 Conclusion.....	30
2. Analyse du matériel végétale issu de pépinière.....	30
2.1 Tableau de profils chromatographiques.....	31
2.2 Aire sous pic.....	32
3. Conclusion.....	33
B. Séparation des composés d'intérêt.....	34
1. Identification des pics collectés.....	34
2. Séparation des pics d'intérêt.....	35
C. Analyse des molécules d'intérêt.....	36
1. Résultat de l'infusion.....	36
2. Hydrolyse.....	37
V. Synthèse.....	39
Lexique.....	40
Récapitulatif des figures et tableaux.....	43
Littérature.....	44

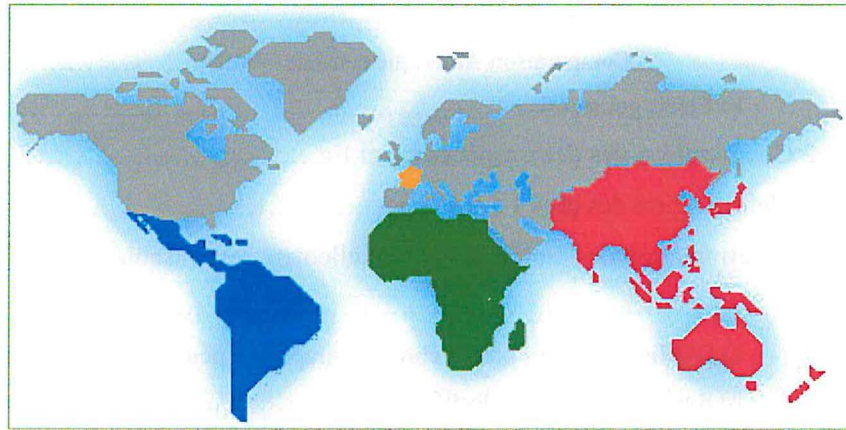


Fig.1 : Le Cirad dans le monde

# Le CIRAD

Une douzaine d'instituts et de centres de recherches spécialisés dans l'agriculture et l'élevage en milieu tropicaux se regroupent en 1984 pour former un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC) : le Cirad, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

## Coopération

La coopération passe par la formation et le transfert du savoir faire.

Le Cirad accompagne les équipes scientifiques du Sud en formant leur chercheurs à la recherche et par la recherche. Il répond aussi aux besoins de formation de responsables, des acteurs du développement et des producteurs des pays du Sud. En 25 ans, sa politique a évolué du transfert à la coproduction des savoirs avec ses partenaires, au sein notamment des pôles de compétences en partenariat.

## Internationale

(Fig. 1) De 1994 à 2009, les engagements du Cirad se maintiennent, excepté sur le continent Africain où les modalités de coopération s'organisent différemment.

Dans l'outre-mer Français, plus de 400 personnes exercent leurs activités au sein de pôles de compétences, comme le pôle de protection des plantes à la Réunion... En métropole, la région parisienne (Maison mère) a connu 2 décentralisations : la première en octobre 1994 vers le site de Lavalette (Montferrier) et la seconde en 1995 vers le site de Baillarguet (Prade-le-lez) à Montpellier.

## Recherche agronomique

Comment le cirad est passé d'une recherche scientifique à l'échelle de l'objet étudié à des projets scientifiques intégrant une palette d'outils, du gène au satellite, qui permet de traiter une masse énorme d'information ?

1993 : Création du réseau Renater, qui donne accès aux nouvelles technologies de l'information et de la communication.

1999 : De nouvelles formes de coopération se tissent avec agropolis et des instituts tel que l'Empraba au Brésil.

2001 : La réflexion éthique s'organise au Cirad tandis que se renforce la pluridisciplinarité des recherches avec l'IRD et l'INRA.

2004 : Le Cirad, avec ses équipes pluri-institutionnelles, travaille à toutes les échelles. Il peut engager un dialogue constructif avec ses partenaires et dans le monde des entreprises pour adapter la coopération aux réalités contemporaines et moderniser, dans le même temps, l'évaluation et le suivi de ses activités.

## Développement

Les objectifs de développement du Cirad peuvent être résumés en 6 mots : Durabilité, respect de l'Environnement, Qualité, Aide à l'autonomie de gestion des pays du Sud, Innovation, Outils.

## Organisation globale

Le Cirad se divise en 3 départements et 56 unités. On peut dénombrer 32 Unités Propres de Recherche (UPR), 4 Unités de Services (US), 20 Unités Mixtes de Recherche (UMR) et 3 Unités de Recherche en Partenariat (URP). L'effectif total est de 1820 personnes.

Le département *Systemes biologique* mène des recherches dans le domaine du vivant, de sa caractérisation et de son exploitation : de la diversité, de la biologie et du fonctionnement des organismes aux relations qu'ils entretiennent entre eux et avec leur milieu.

Le département *Performance des systemes de production et de transformation tropicaux* (PERSYST) s'intéresse aux processus biologique en interaction avec les conditions environnementales et les interventions techniques.

Enfin, le département *Environnement et Société* centre ses recherches sur les relations entre agriculture, gestion des ressources naturelles et dynamiques sociales, en lien avec les politiques publiques.

C'est au sein du département PERSYST et plus précisément dans l'UMR Qualisud que s'est déroulé mon stage. Cette UMR a été créée en janvier 2007 et regroupe des chercheurs du Cirad, des Université Montpellier I et II et de Montpellier SupAgro.

Les travaux conduits chez Qualisud visent à une meilleure compréhension de l'élaboration de la qualité et à une meilleure connaissance du poids de chacune de ses composantes tout au long de la chaîne de production/transformation/distribution grâce à la mise en œuvre d'une démarche intégrée qui assure la maîtrise du couple produit/procédé. Il s'agit en effet à la fois d'améliorer en quantité, en diversité et en qualité, la disponibilité des produits alimentaires, en particulier sur les marchés du Sud, et de permettre aux transformateurs de ces pays d'exporter sur les marchés du Nord où les normes de qualité sont toujours plus exigeantes.

L'UMR Qualisud se divise en 4 équipes :

**Équipe 1** : Déterminants de la qualité organoleptique et nutritionnelle des produits frais et des produits transformés,

**Équipe 2** : Typicité, préservation et contrôle de la qualité des produits végétaux,

**Équipe 3** : Procédés de stabilisation et de transformation,

**Équipe 4** : Maîtrise des contaminants de la chaîne alimentaire,

Lors de mon stage de 6 mois au CIRAD j'ai été accueilli au sein de l'équipe 1 de l'UMR Qualisud afin de participer à un projet portant sur le palmier à huile, en collaboration avec une entreprise privée : PalmElit.



## PalmElit

Le Cirad a créé en avril de cette année la société PalmElit, installée à Montferrier, dans le parc d'activité d'agropolis, avec à sa tête Christian Picasso. PalmElit est une filiale du Cirad qui en détient les 2/3, le reste étant détenu par Sofiprotéol, établissement financier de la filière des oléagineux et protéagineux.

PalmElit participe activement au développement de la filière : elle est présente de l'innovation à la production jusqu'à la mise sur le marché. Elle ne se contente pas de développer ses productions de semences, elle poursuit aussi la recherche appliquée sur des variétés de palmier pilote via des expatriés, des projets innovants en matière d'hybridation de variétés d'Amérique et d'Afrique et la production in vitro de plants.

Son objectif est de valoriser les recherches du Cirad sur le palmier à huile et plus particulièrement sur l'amélioration du palmier à huile. A ce titre PalmElit peut s'associer aux équipes de recherche du Cirad pour monter des projets de recherches palmier et contribuer à leur financement.

## Abréviations

**A.C** : Amérique centrale

**BC1**: Back cross 1<sup>ère</sup> génération

**BC2**: Back cross 2<sup>nd</sup> génération

**C°**: Celsius

**Cirad**: Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

**DOM-TOM**: Département d'Outre Mer- Territoire d'Outre Mer

**Eg**: *Elaeis guineensis*

**Eo**: *Elaeis oleifera*

**EPIC** : Etablissement public à caractère industriel et commercial

**ESI** : Electrospray ionisation

**HPLC**: Chromatographie liquide à haute performance

**Hyb**: Hybride

**INRA** : Institut National de Recherche Agronomique

**IRD** : Institut de Recherche et Développement

**LC-MS** : Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

**LM** : Lomé

**mAU** : milli absorbance unit

**MetOH**: Méthanol

**min**: minute

**ml**: millilitre

**mM**: milli mole

$\mu$ l: microlitre

**N°**: Numéro

**PERSYST** : Performance des Systèmes de production et de transformation Tropicaux

**PO**: Pobé

**RT** : Temps de rétention

**UMR** : Unité Mixte de Recherche

**UPR** : Unité Propre de Recherche

**URP** : Unité de Recherche en Partenariat

**US** : Unité de service

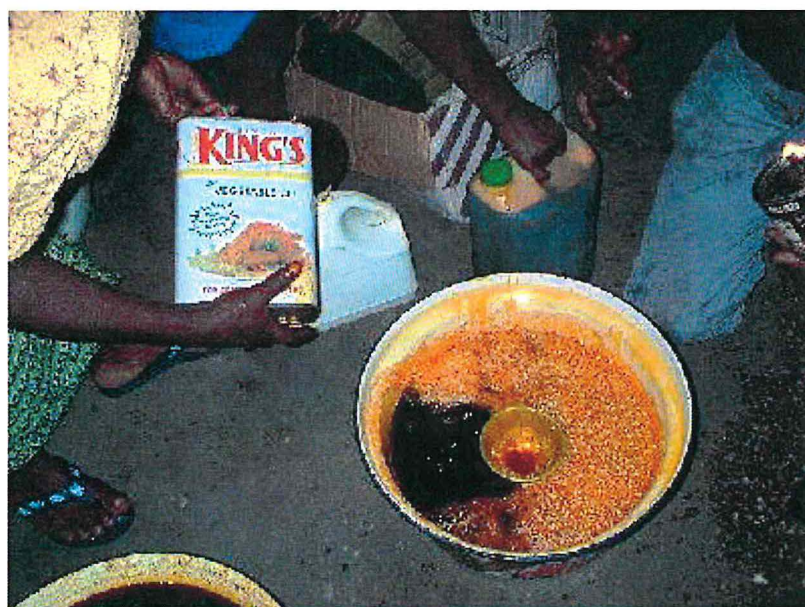


Fig.2 : Huile de palme artisanale

# I. Introduction

Le palmier à huile est largement cultivé pour ses fruits et ses graines riches en huile à usage alimentaire et industriel. La pulpe de ces fruits peut être pressée pour obtenir l'huile de palme rouge ou "huile de palme". L'huile de palme représente de 18 à 26 % du poids frais d'un régime. C'est une huile d'une très bonne qualité nutritive car riche en caroténoïdes (d'où la couleur rouge) (Fig. 2) qui est à la base de nombreux régimes alimentaires, notamment en Afrique. Après avoir été raffinée, blanchie et désodorisée, l'huile de palme est un composant essentiel de l'industrie agro-alimentaire : On en retrouve dans les margarines, les pâtes à tartiner, certaines huiles alimentaires, les biscuits, les glaces et autres confiseries.

L'amande blanche contenue dans les fruits peut aussi être pressée pour obtenir l'huile de palmiste. Les quantités extraites sont beaucoup moins importantes et ne représentent que 2 à 3% du poids frais d'un régime. L'huile de palmiste est utilisée davantage par l'industrie cosmétique (savons et crèmes), l'industrie chimique (vernis, peinture, résine) et la fabrication de détergents (lessives). Les résidus solides de pressage appelés "tourteaux" sont valorisés comme aliments pour animaux.

L'huile de palme fait partie des matières premières émergentes qui ont fait irruption sur le marché mondial au cours de ces 30 dernières années et dont le poids ne cesse d'augmenter aussi bien pour les pays producteurs que pour les pays consommateurs. On notera pendant cette période une évolution tout à fait similaire entre l'huile de palme et l'huile de soja, passées de quelques millions de tonnes dans les années 60 à environ 30 millions de tonnes aujourd'hui. Notons cependant que le rendement du palmier est environ 10 fois supérieur à celui du soja.

Les besoins mondiaux en huile de palme seront à long terme très élevés pour répondre aux demandes de l'industrie agro-alimentaire et de l'oléo-chimie.

L'huile de palme est majoritairement consommée dans les pays en développement fortement peuplés (Chine, Inde, Indonésie, Nigéria, etc.), mais l'Europe est devenue le second importateur derrière la Chine.

Les palmeraies et les huileries, ainsi que l'ensemble des services liés à la production, contribuent à développer des économies locales dans des lieux souvent pionniers, et environ 4 millions de personnes dans le monde vivent de cette industrie.

S'il existe toujours, en Afrique, une exploitation traditionnelle de la palmeraie, la multiplication des plantations agro-industrielles de grandes dimensions a participé à la croissance exponentielle de la production d'huile de palme et de palmiste (doublement tous les 10 ans au cours de ces 40 dernières années). Mais cette hausse de la production est aussi due au développement rapide des petites plantations familiales qui fournissent maintenant environ 30 % de la production totale.

Le palmier à huile est, de très loin, l'oléagineux le plus productif (de 7 à 10 fois supérieur à ses concurrents directs comme le soja, le colza et le tournesol). Le palmier à huile produit, en moyenne, près de 4 tonnes d'huile (palme + palmiste) par hectare et par an.

*Tableau 1 : Les productions mondiales d'huiles végétales en 2005 (en millions de tonnes)*

Soja	Colza	Tournesol	Coprah	Palme + Palmiste
33.47	15.93	9.65	3.25	33.66 +3.96

Les défis lancés à la filière sont nombreux et de nouvelles questions sont proposées au monde de la recherche :

- . Comment intensifier les systèmes de production d'huile de palme sur les plantations existantes afin de limiter, autant que possible leurs agrandissements, et sans effets négatifs sur l'environnement ?
- . A partir de quels critères choisir des nouveaux sites de plantation en préservant au maximum les zones à biodiversité riche ?
- . Comment porter un jugement scientifique rigoureux sur les effets des différentes huiles et matières grasses sur la santé humaine, afin de sortir d'une polémique de consommateurs vieille de plus de 20 ans ?

Dans ce contexte, le Cirad se mobilise, en étroite liaison avec ses partenaires privés et publics, avec pour objectifs :

- une culture du palmier à huile durable et respectueuse de la biodiversité
- l'amélioration d'un matériel végétal performant, résistant aux maladies mortelles
- la mise au point d'indicateurs agri-environnementaux
- l'appui aux petits planteurs peu organisés structurellement.

Les palmeraies sont soumises à différentes endémies, comme la fusariose vasculaire en Afrique, le Ganoderma en Asie de sud-est et la pourriture du cœur en Amérique latine. Il existe des résistances face à ces trois grandes maladies qui ravagent les exploitations. Ces résistances sont exploitées et intégrées dans les schémas de sélection par les généticiens.

En Afrique, un nouvel insecte, le *Coelaenomenodera lameensis*, attaque les feuilles des palmiers adultes (*Elaeis guineensis*), et provoque une chute de la production d'huile d'environ 60 %.

Cependant une espèce de palmier résiste à cette mineuse : *Elaeis oleifera*.

C'est sur cette observation que se base maintenant le travail des généticiens, chercheurs et entomologistes afin de faire reculer cette nouvelle endémie.

Deux espèces d'*Elaeis* sont mises en avant, *Elaeis guineensis* (Eg) qui est l'arbre producteur d'huile par excellence mais sensible à la mineuse et *Elaeis oleifera* (Eo), arbre de petite taille, produisant une huile de qualité supérieure, mais en quantité très faible, et résistant à la mineuse.

Des premiers tests ont été effectués afin d'observer les différences de profil moléculaire entre Eg et Eo.



Fig.3 : *Elaeis guineensis*



Fig.4 : Représentation schématique d'une palme



Fig.5 : Inflorescence femelle et mâle d'un palmier à huile

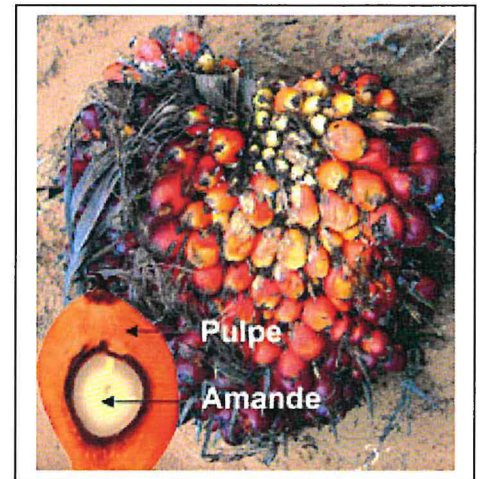


Fig.6 : Infructescence et coupe longitudinale d'un fruit de palmier à huile

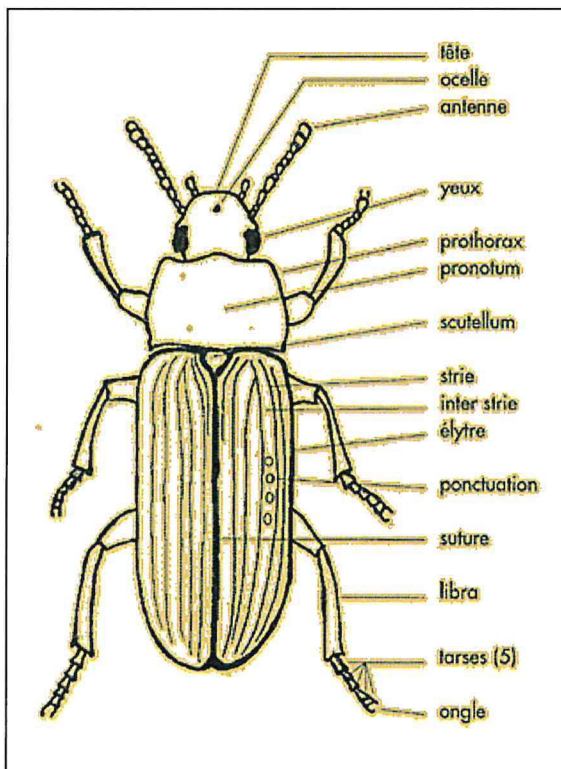


Fig.8 : Représentation schématique de l'anatomie des coléoptères

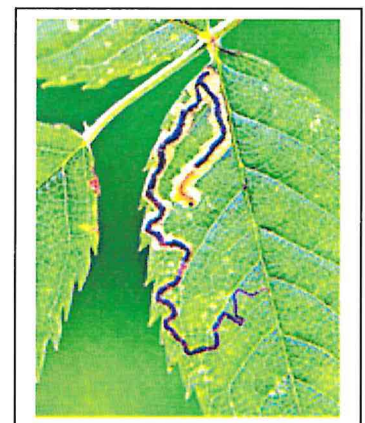


Fig. 7 : Dégâts réalisé par une mineuse

## II. Travaux antérieurs

### Le palmier à huile, description botanique

Le palmier à huile *Elaeis guineensis* Jacq. est, comme son nom l'indique, originaire du golfe de Guinée. C'est une monocotylédone de la famille des Arecaceae, genre *Elaeis* (Fig.3). Au stade adulte, il est constitué d'un stipe d'environ 30 centimètres de diamètre, dont la vitesse de croissance est variable en fonction des conditions agro-climatiques et peut atteindre 20 mètres de hauteur vers l'âge de 30 ans.

Il est formé d'une moelle centrale et de fibres de plus en plus denses en allant vers la périphérie. Au sommet, il se termine par un bourgeon végétatif et est couronné par un ensemble de 40 à 50 feuilles allant de 5 à 7 mètres de long. Chaque palme, dont la durée de vie est d'environ deux ans, est constituée par 150 paires de folioles insérées de part et d'autre du rachis central (Fig.4). Une inflorescence mâle ou femelle (plante monoïque) se développe à l'aisselle de chaque feuille (Fig.5). L'inflorescence est initialement enfermée dans une spathe. Le fruit est une drupe allongée. Sous l'épiderme qui le recouvre, on observe le mésocarpe ou pulpe de couleur orangée, à partir de laquelle on extrait l'huile de palme. L'endocarpe ou coque, renferme l'amande de couleur blanche de laquelle on extrait l'huile de palmiste (Fig.6).

### Coelaenomenodera lameensis, la mineuse du palmier à huile

Les mineuses sont des chenilles de lépidoptères, d'hyménoptères ou des asticots de diptères phytophages qui creusent dans le limbe des feuilles des galeries, entre les 2 épidermes du limbe d'une feuille, formant ce que l'on appelle une mine (Fig.7). La géométrie de la mine (linéaire, ramifiée, en spirale, etc.) et la disposition du "frass" (excréments et vermoulure) permettent en général une détermination précise du ravageur. L'excavation s'élargit au fur et à mesure de leur croissance.

La mineuse du palmier à huile fait partie de l'ordre des Coléoptères (contient le plus grand nombre d'espèces dénombrés par l'humain) (Fig.8).

Parmi les coléoptères on trouve de nombreuses familles dont :

*Anobiidae* (Stégobie des pharmacies, Vrillette boulangère, Vrillette du pain); *Anthicidae*; *Anthribidae* (Bruche des grains de café, Fausse bruche du café); *Brentidae*; *Buprestidae*; *Carabidae* (Carabe doré, Carabe à reflet cuivré, Bembidion, *Harpalus*, *Pterostichus*); *Cerambycidae* ou Longicornes (Capricorne, Lepture tachetée, *Strangalia maculata*); *Cetoniidae* (Cétoine dorée); *Chrysomelidae* (Chrysomèle ou Mélasome du peuplier, Doryphore, *Coelaenomenodera lamensis*).



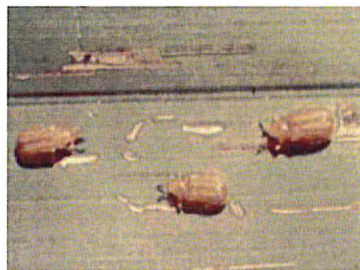


Fig.9: Photographie sous loupe  
binoculaire de *Coelaenomenodera  
lameensis*

Chaîne carbonée	Classe	Exemple de molécule
C6	Phénol simple	Cathécol
C6-C1	Acide hydroxybenzoïque	p-hydroxybenzoiique
C6-C3	- Acide hydroxycinnamique - Coumarines	Acide caféique Scopolétine
C6-C4	Naphtoquinone	Juglone
C6-C2-C6	Stilbène	Resvératrol
C6-C3-C6	Flavonoïde - Flavonol - Chalcone - Flavanone - Flavanol - Isoflavonoïde - Anthocyane	Quercitine Butéine Naringénine Catéchine Diadzéine Cyanidine
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignane	
(C6-C3) <sub>n</sub>	Lignine	
(C15) <sub>n</sub>	Tanins	

Fig.10 : Tableau récapitulatif des différentes classes de polyphénols

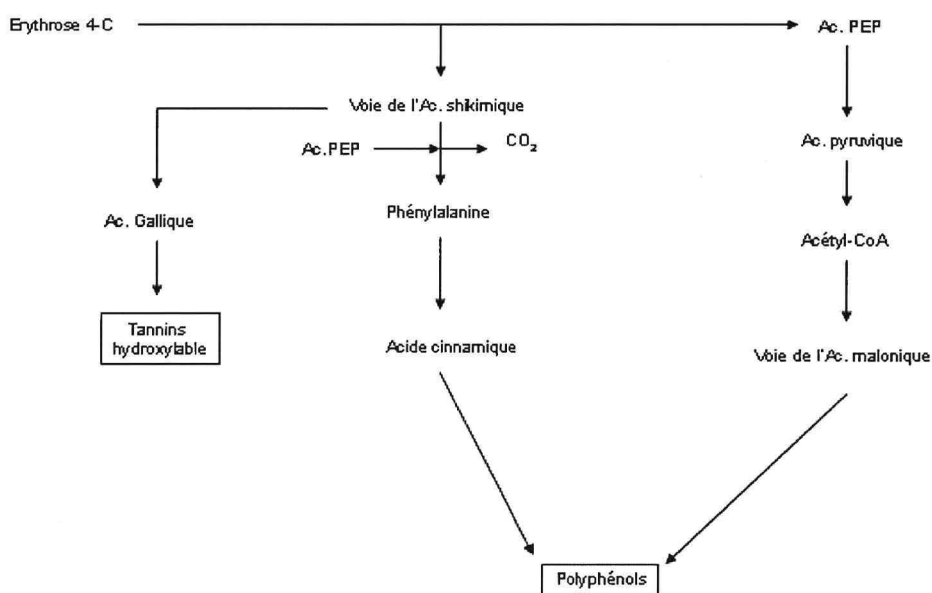


Fig.11 : Biosynthèse des polyphénols

*Coelaenomenodera lameensis*, n'a été que récemment décrit parce que précédemment dénommé, à tort, *C. elaeidis* Maulik puis *C. minuta* Uhmman, ces deux dernière espèces ayant été mises par la suite en synonymie (Fig.9).

De couleur orangé, l'adulte mesure de 5 à 6 millimètres. La larve, dont le corps est adapté au comportement mineur de l'insecte, est aplatie dorso-ventralement. Elle est fortement segmentée avec des prolongements latéraux marqués. La capsule céphalique est profondément enchâssée dans les deux lobes très développés du segment thoracique. La nymphe est de couleur jaune orangé ; elle est mobile et nue. Les adultes vivent à la surface inférieure des feuilles et ils se nourrissent en creusant des petits sillons de 1 à 2 centimètres de longueur. Après éclosion, l'œuf, inséré dans l'épaisseur de la foliole, libère la larve qui creuse une galerie dont la taille varie selon les stades larvaires et le nombre d'individus qu'elle contient. La nymphose s'effectue dans cette galerie d'où sort l'adulte en coupant l'épiderme supérieur de la foliole.

Une galerie larvaire n'affecte que quelques centimètres carrés de feuillage, mais en cas de pullulation on peut dénombrer par palme plus d'un millier de larves, à l'abri dans des centaines de galeries, qui détruisent la presque totalité de la surface foliaire.

### Relation Palmier à huile / Mineuse

La mineuse du palmier à huile est présente seulement en Afrique de l'ouest dans le golfe de Guinée. Cette partie du monde réalise 5 % de la production mondiale d'huile de palme et de palmiste. Les attaques de *Coelaenomenodera lameensis* affectent le palmier le plus productif : *Elaeis guineensis*, en faisant diminuer de 60 % la collecte d'huile. Pour préserver la culture du palmier à huile et afin de prévenir à une éventuelle prolifération de la mineuse dans d'autres parties du monde, des travaux scientifiques sont nécessaires.

### Les polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires de la plante comme les terpènes et les produits du métabolisme secondaire contenant de l'azote. On en a identifié 50 000 et on pense en identifier 150 000. Les fonctions précises de certains métabolites secondaires en tant qu'hormones végétales ou substances de défense sont reconnues depuis longtemps.

Les polyphénols contiennent un noyau aromatique plus un groupe hydroxyle. On distingue 9 principales classes de phénols (Fig.10). Leur biosynthèse fait intervenir deux voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide malonique (Fig.11). Leurs rôles sont divers par exemple :

- Relation plante-environnement (protection contre l'excès de lumière)
- Phénomène d'allélopathie (intoxication des plantes voisines par les racines)
- Résistance mécanique (lignine)

- Défense (insecticides, toxicité, blocage de la progression des pathogènes, amplification des signaux de défense)
- Protection contre le rayonnement UV
- Attraction des insectes et des oiseaux
- Santé (diminue les risques cardio-vasculaires, anti-cancérigène)

C'est pour leur rôle de défense contre les insectes qu'il a été décidé d'orienter cette recherche vis-à-vis de la mineuse vers les polyphénols.

Lors de ce stage, ma mission était :

- Observer et analyser les différences de profils (HPLC) polyphénoliques sur différents matériels
- Isoler et identifier les molécules potentielles de la résistance.

Ce stage a été réalisé en collaboration avec plusieurs équipes :

Génétique du palmier, entreprise PalmElit

Entomologie, équipe Bios CIRAD

Chercheur Béninois, CRA-PP/Pobé

Analytique, UMR Qualisud CIRAD

Les objectifs de recherche ont été définis après chaque réunion bimensuel regroupant l'ensemble des équipes.

### III. Matériels et Méthodes

#### A. Matériels

Le matériel végétal utilisé (feuilles fraîche de palmier à huile) a été importé par avion des plantations de Pobé et d'Akpadanou au Bénin par des missionnaires du Cirad.

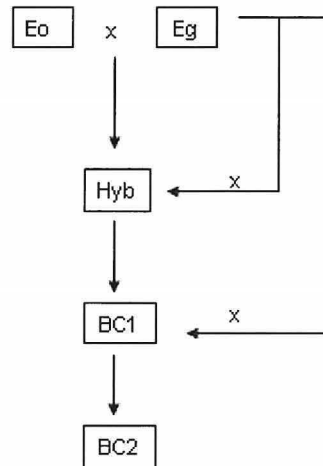
Pour les analyses sur arbre adulte c'est la 17<sup>ième</sup> feuille qui a été choisie et prélevée, pour les plants en pépinière ce sont 3 jeunes pousses qui ont été prélevées.

##### 1. Tableaux du matériel végétal analysé

Matériel	Origine	Parcelle	Ligne	Arbre	N° de la famille
<b>Elaeis guineensis</b>					
Adulte	Lomé	446	5	3	
Adulte	Lomé	446	4	4	
Adulte	Yocoboué	446	14	5	
Adulte	Déli	446	24	6	
Jeune plant 2008	Déli				PO 8424
Jeune plant 2008	Déli				PO 8220
Jeune plant 2008	Lomé				PO 8261
Jeune plant 2009	Déli				PO 9046
Jeune plant 2009	Déli				PO 9002
Jeune plant 2009	Lomé				PO 9029
<b>Elaeis oleifera</b>					
Adulte	Amérique centrale	437			
Adulte	Amérique centrale	437	33	9	
Adulte	Amérique centrale	437	34	9	
Adulte	Brésil	427			
Adulte	Brésil	427	5	12	
Adulte	Brésil	427	8	13	
Adulte	Brésil	427	3	11	
Jeune plant 2008	Brésil				PO 8447

Jeune plant 2008	Amérique centrale				PO 8351
Jeune plant 2008	Amérique centrale				PO 8277
Jeune plant 2009	Brésil				PO 9057
Jeune plant 2009	Amérique centrale				PO 8877
Jeune plant 2009	Amérique centrale				PO 9010
<b>Hybrides</b>					
Hyb1 (adulte)					
Hyb2 (adulte)					
Hyb3 (adulte)		C 02	2	16	PO 5378
Hyb4 (adulte)		C 02	12	25	PO 5276
Hyb5 (adulte)		C 02	29	2	PO 5270
Hyb6 (adulte)		D 03	23	5	PO 4768
Hyb7 (adulte)		E 03	16	17	PO 4774
<b>Back cross 1<sup>ière</sup> génération à tendance morphologique Eo</b>					
BC1 (adulte)		270	34	24	PO 5238
BC1 (adulte)		270	18	3	PO 6222
BC1 (adulte)		270	21	22	PO 6322
BC1 (adulte)		270	27	22	PO 6271
BC1 (adulte)		270	54	12	PO 5811
<b>Back cross 1<sup>ière</sup> génération à tendance morphologique Eg</b>					
BC1 (adulte)		270	34	23	PO 5238
BC1 (adulte)		270	18	2	PO 6222
BC1 (adulte)		270	21	23	PO 6322
BC1 (adulte)		270	27	23	PO 6271
BC1 (adulte)		270	54	11	PO 5811
<b>Back cross 2<sup>nde</sup> génération issu de la pépinière</b>					
BC2 (2008)					06/2
BC2 (2008)					05/9
BC2 (2008)					05/4
BC2 (2009)					PO 9050
BC2 (2009)					PO 8793
BC2 (2009)					PO 8919

## 2. Rappel de génétique



## 3. Liste du matériel chimique utilisé

- Acétone
- Acide formique
- Eau ultra pure
- Méthanol
- Acide chloridrique
- NaOH
- EDTA
- Azote liquide
- Hexane
- Chloroforme
- Ethanol

## B. Méthodes

### 1. Extraction des polyphénols

Les feuilles de palmier ôtées de leur nervure principale sont broyées dans l'azote liquide. L'extraction pour 1g de feuille est réalisée avec un mélange 70 % / 30 % acétone / eau acidifiée à 5 % acide formique. Agitation magnétique pendant 1h et filtration sous vide sur papier filtre.

### 2. Analyse chromatographique

#### 2.1 Analyse par chromatographie analytique

Le système de Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) de marque Dionex est équipé d'un dégazeur, d'une pompe, d'un injecteur, d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) et d'une colonne.

La colonne ACE 5C18 250 x 4,6 mm de type apolaire est située dans un compartiment thermostaté à 30°C.

Les phases mobiles sont : A= H<sub>2</sub>O 0,8 % méthanol (MetOH) pH=3,8 acide formique

B= 100 % MetOH Le débit de la colonne est de 1 ml/min.

Le gradient d'élution est : Temps 0 : 25 % B

Temps 15 : 25 % B

Temps 30 : 70 % B

Temps 40 : 100 % B

Temps 50 : 25 % B

Le débit est de 1 ml/min

La longueur d'onde privilégiée est 330 nm

#### 2.2 Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Le chromatogramme UV (ThermoElectron) est associé à un spectromètre de masse à trappe d'ion (LCQ Advantage de marque ThermoElectron). La colonne, les solvants d'élution et le gradient sont identiques à ceux utilisés en HPLC analytique.

Le spectromètre de masse est utilisé avec une source ESI. Les paramètres d'ionisation sont : Température du capillaire : 330°C, electrospray : 3,5kV, gaz principale 6.20 sheath gaz : 70 en mode négatif

Le débit est réduit à 0.7 ml/min pour une nébulisation optimale.

### 2.3 HPLC semi-préparative

La semi-préparative est une HPLC dont le diamètre de la colonne permet l'injection de volume élevé (boucle d'injection 5 ml) complétée de pompes pouvant fonctionner à des débits élevés (50 ml/min). Elle est équipée d'un collecteur de fraction piloté par un logiciel informatique (NOM).

Deux colonnes de phase différente (10 et 5 microns) ont été nécessaires pour mener à bien la purification.

#### Colonne 1

Colonne Knauer® 250 x 20 mm remplie de phase Eurosphère C18 10 microns et ayant une porosité de 100 Å.

Une boucle de 5 ml a été utilisée.

La phase mobile et la longueur d'onde reste inchangées et le gradient est:

- de 0 à 5 min, 40 % de B
- de 5 à 35 min, 60 %
- de 35 à 45 min, 100 % de B
- de 45 à 55 min, 25 % B,

Le débit est de 10 ml/min avec un volume d'injection de 5 ml.

Les fractions collectées sont ensuite concentrées à l'évaporateur rotatif.

Une seconde purification est nécessaire :

#### Colonne 2

Colonne Merck Hibar® Fertigsäule 250 x 10 mm remplie d'une phase Licrospher C18 5 microns et ayant une porosité de 100 Å.

Une boucle de 1 ml a été utilisée.

La phase mobile et la longueur d'onde reste inchangées.

Le gradient devient : 50 % A et 50 % B pendant 25 à 50 min, selon les échantillons, avec un débit de 1 ml/min pour un volume injecté de 1 ml.

## 3. Hydrolyse

### 3.1 Hydrolyse acide

Une solution de 30 µl de l'échantillon à hydrolyser est amenée à sec sous azote puis réhydratée avec 10 ml d'HCl 4N. Le mélange est maintenu à 45°C pendant 1h au bain-marie, évaporé à sec sous azote (température 40°C), et redissous dans 600 µl de MetOH.

Les produits de réaction sont analysés par LC-MS.





Fig.12 : Photographie d'un manchon sur palme à Pobé (Bénin)

### 3.2 Hydrolyse alcaline

Une solution de 30  $\mu\text{l}$  de l'échantillon à hydrolyser est amenée à sec sous azote, puis mélangée à 30  $\mu\text{l}$  d'une solution de NaOH 2N contenant 0.037 g d'EDTA à 10 mM et 1% d'acide ascorbique. La solution est conservée pendant 30 min à 45°C et 570  $\mu\text{l}$  de MeOH sont ensuite ajoutés.

Les produits de réaction sont analysés par LC-MS.

En parallèle à cette étude, des tests biologiques sont effectués au Bénin à la station de Pobé. Lors de ces tests des manchons en mousseline aérée sont installés autour des feuilles de palmier. A l'intérieur des manchons sont insérées des mineuses. Le manchon est retiré au bout de 95 jours (cycle de l'insecte) ou un décompte des œufs, des larves sont effectuées. Le taux de mortalité est calculé à chaque (Fig. 12). Ceci nous permet de noter la résistance vis-à-vis de l'insecte et ainsi d'effectuer une comparaison entre les études laboratoire et les études de terrain.

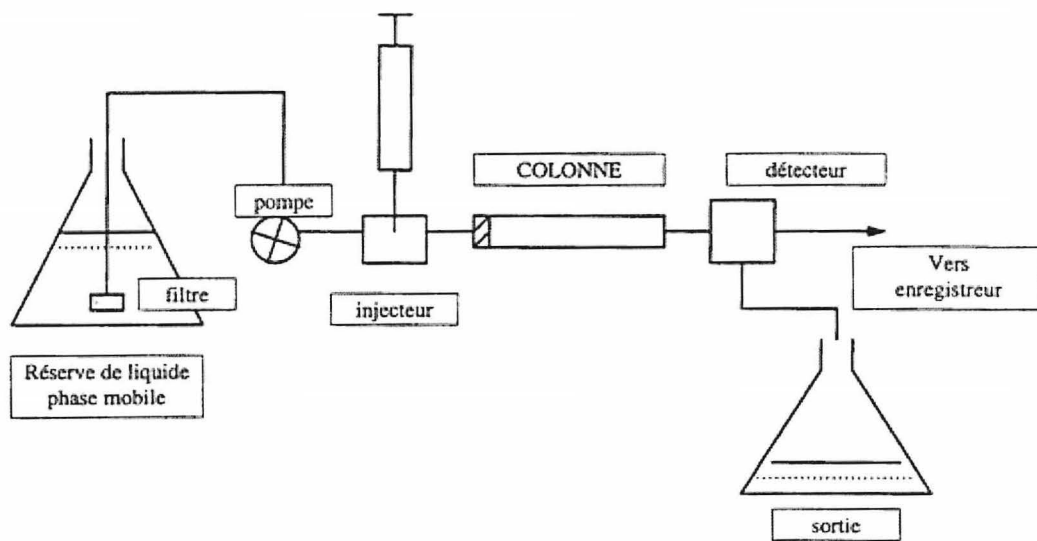


Fig.13 : Représentation schématique des différents organes composant une HPLC

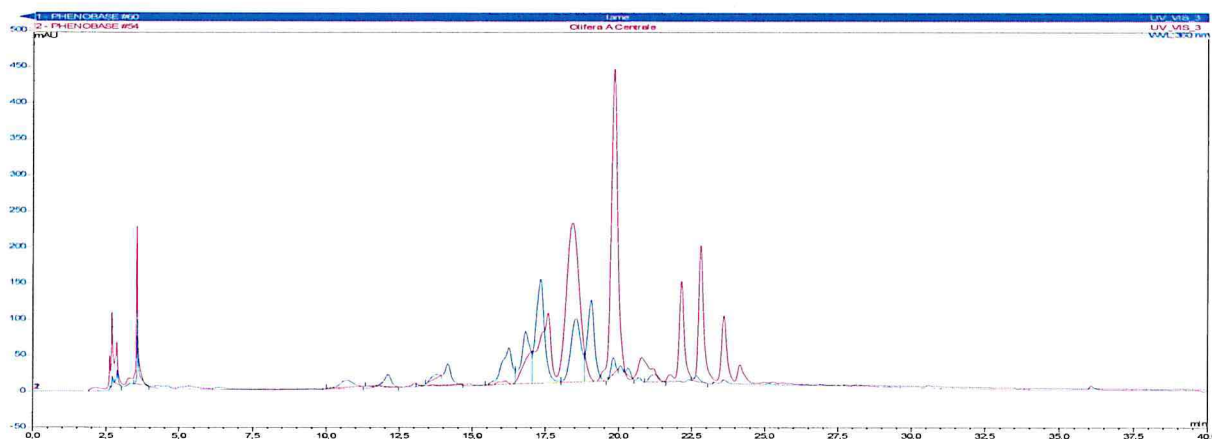
## IV. Résultats et Discussion

### A. Analyse des profils chromatographiques de différents matériels

Les profils chromatographiques des différents matériels sont obtenus par HPLC (Fig.13). Ils sont analysés et comparés afin de désigner les molécules responsables de la résistance vis-à-vis de la mineuse chez *Eo*.

Pour trouver le gradient d'élution adéquat en HPLC, plusieurs essais préliminaires ont été nécessaires afin d'obtenir une séparation fine avec un temps d'analyse le plus court possible.

Lors de travaux antérieur au Bénin la différence notoire entre les profils des deux espèces *guineensis* (sensible) et *oleifera* (résistante) avait été observé. Mon travail a permis d'affiner cette approche.



#### 1. Analyse du matériel adulte

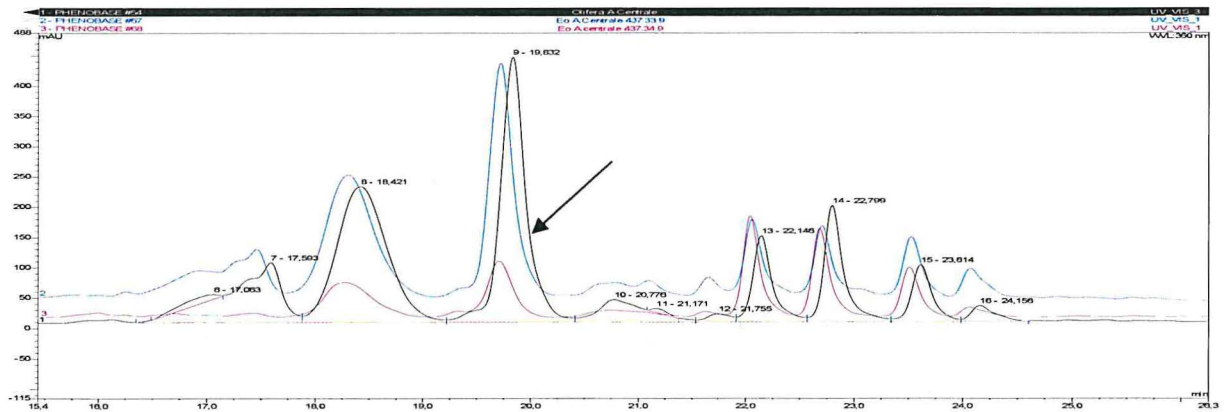
##### 1.1 Comparaisons des différentes origines d'une même espèce

Dans un premier temps les profils chromatographiques d'arbres issus de la même origine ont été comparés. Deux origines pour l'espèce *oleifera* et trois origines pour l'espèce *guineensis* ont ainsi été étudiées. Chaque origine d'une même espèce est ensuite comparée, ainsi que les chromatogrammes obtenus pour les deux espèces (*oleifera* et *guineensis*).

##### a) *Elaeis oleifera*

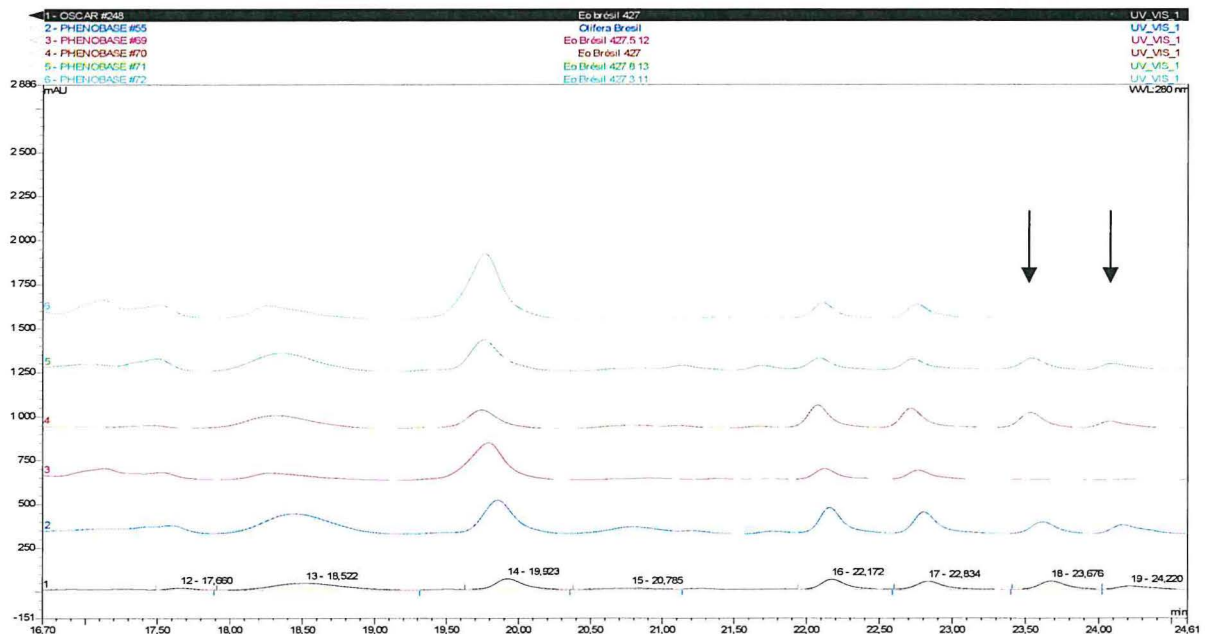
Dans cette espèce 2 origines sont séparées, l'Amérique centrale et le Brésil. Une observation et une comparaison de leurs profil chromatographique a été réalisé.

- Origine Amérique centrale



Ces trois profils sont identiques. La seule différence entre ces arbres provient de l'intensité relative des pics. Remarquons notamment la différence de concentration des pics désigné par →.

- Origine Brésil



Pour les palmiers 427.5.12 et 427.3.11 notons l'absence des deux pics terminaux. Cependant le reste des chromatogrammes est strictement superposable

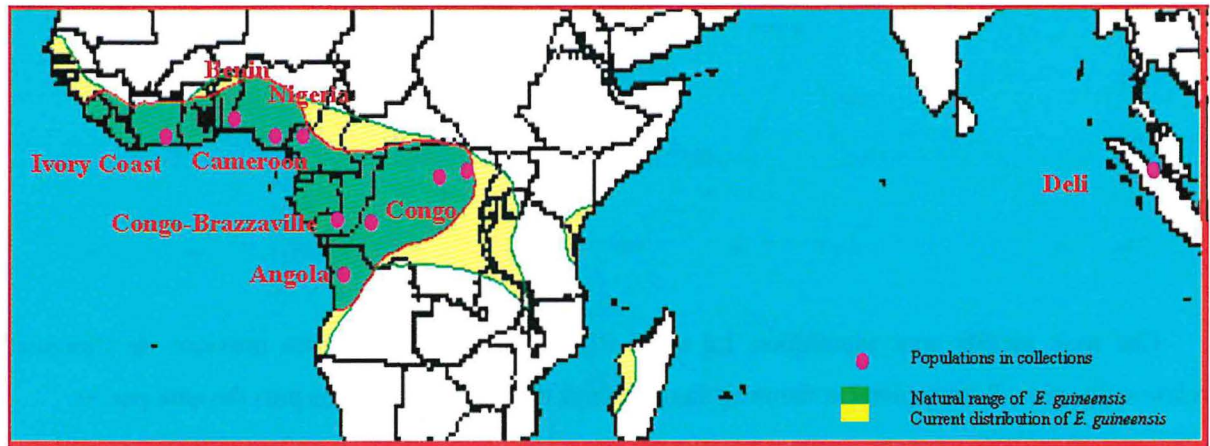
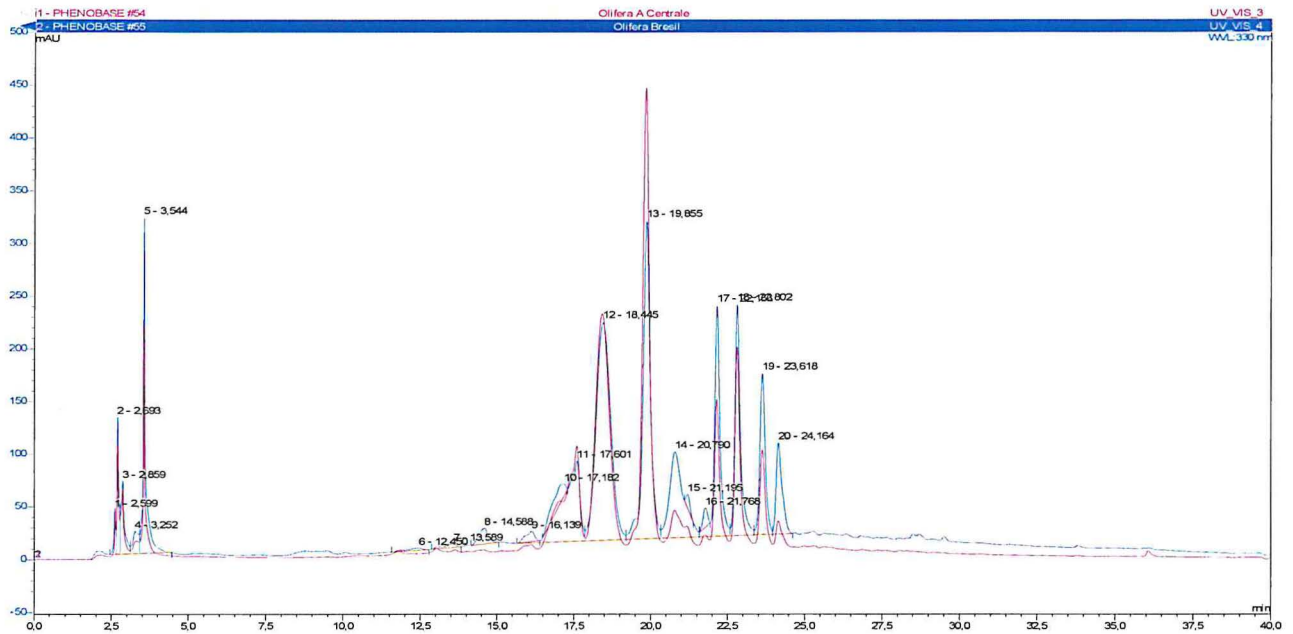


Fig.14 : Carte de la distribution des *Elaeis guineensis* mondiale

- Comparaison Amérique centrale / Brésil

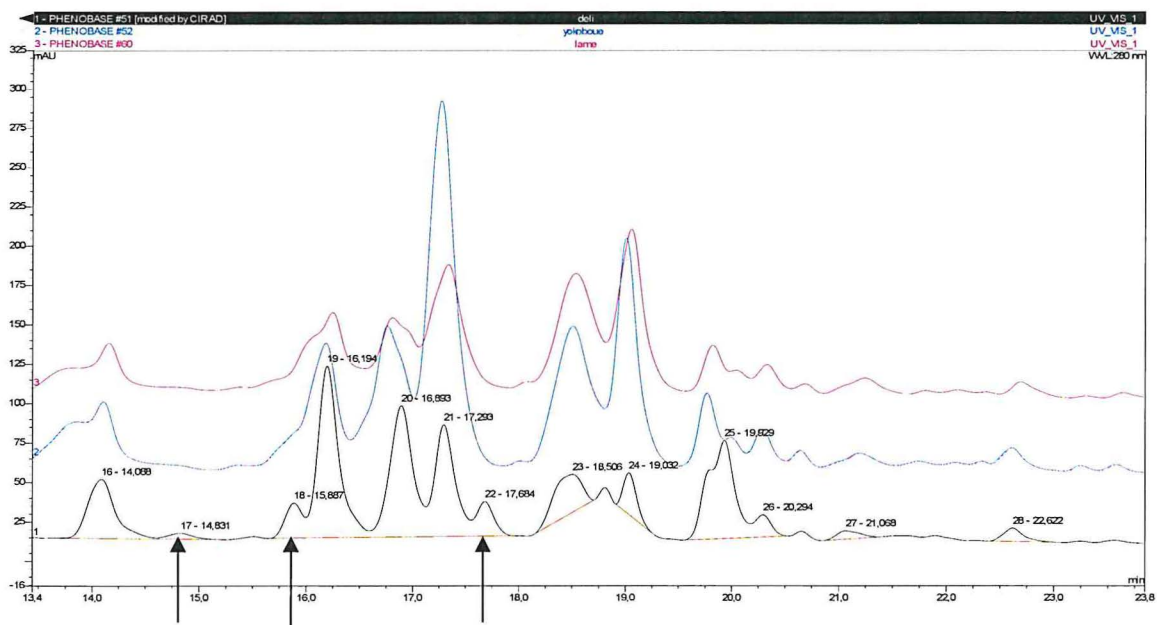


Hormis les différences d'intensité, ces deux chromatogrammes sont identiques. Il sera donc possible d'effectuer la comparaison entre un Eg et un Eo avec un Eo Amérique centrale ou un Brésil.

b) *Elaeis guinnensis*

Pour l'espèce Eg sont étudiées et comparées 3 origines différentes (Fig.14) :

- Lomé (Togo)
- Yocoboué (Cote d'ivoire)
- Déli (Indonésie)

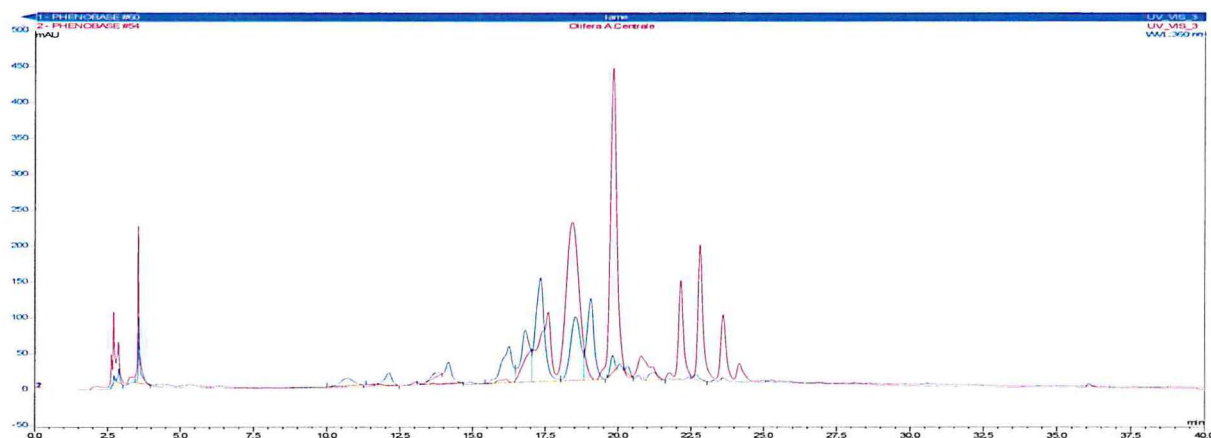


Les profils de Yocoboué et de Lomé présentés sur le chromatogramme 4 sont identiques, avec des variations de concentration pour certains pics.

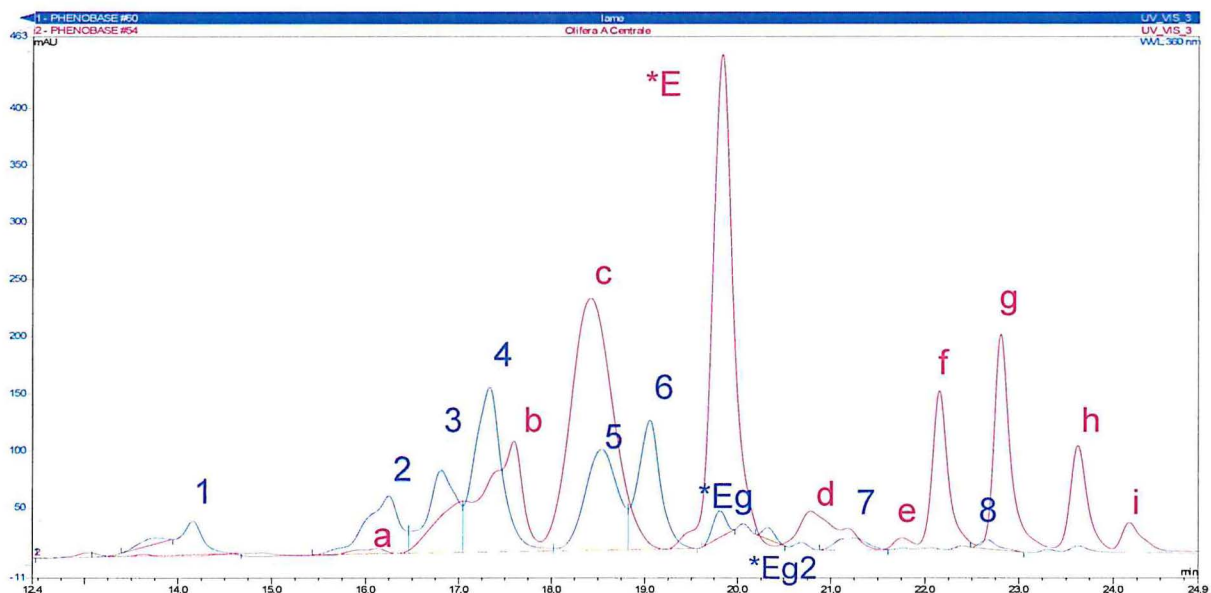
Le profil Déli montre quelques différences désignées sur le chromatogramme 4 par des flèches. Ces différences étant mineures, avec des concentrations très faibles, nous considérons ces trois profils comme identiques.

## 1.2 Comparaison des deux espèces Eo et Eg

Une comparaison des chromatogrammes des deux espèces entre elle (Eo et Eg) a été réalisée.



Les deux espèces Eo et Eg ont des profils chromatographiques très différents. Un zoom sur la partie centrale du chromatogramme est effectué afin d'avoir une meilleure visibilité des différences chromatographiques.





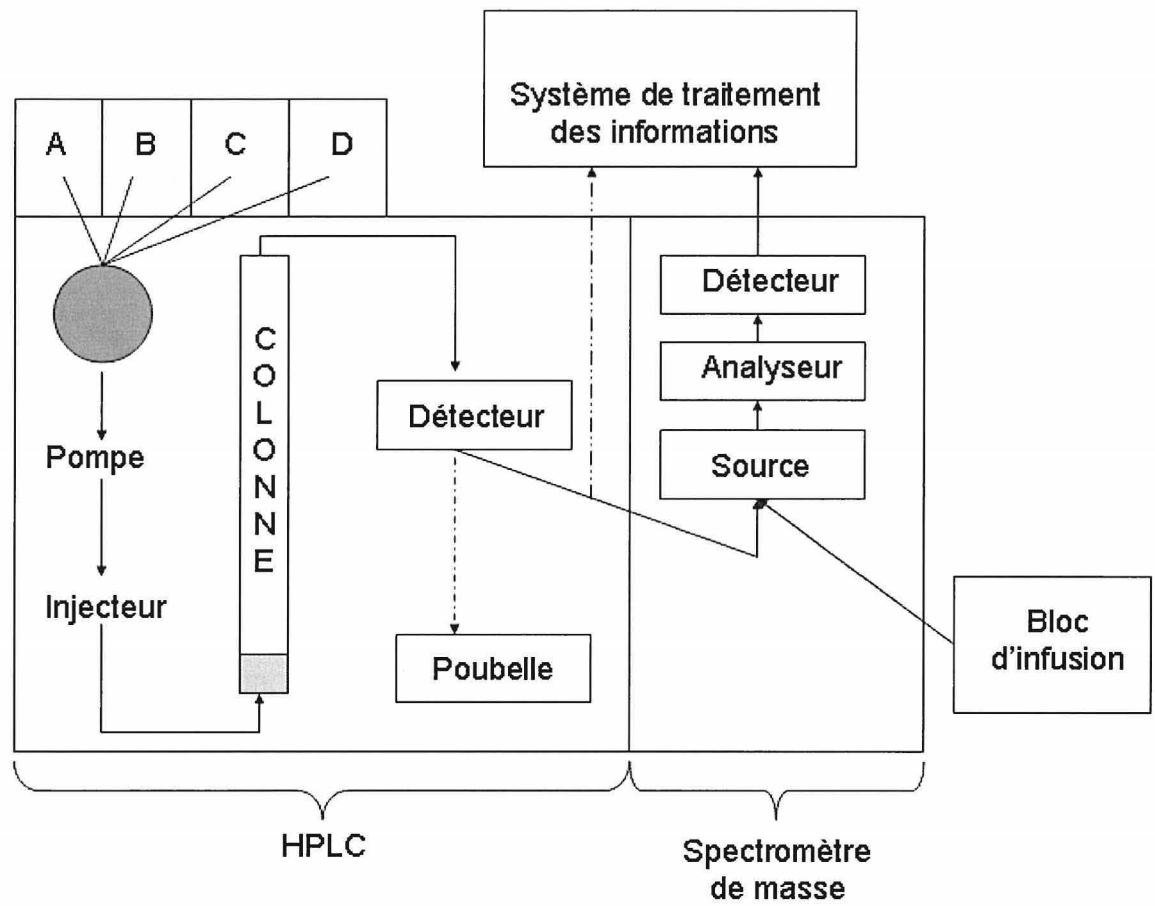


Fig.15 : Représentation schématique du dispositif LC-MS

Une notation de 1 à 8 est utilisée pour les pics Eg et correspond au code couleur bleu ; pour les pics Eo la notation va de a à i avec le code couleur rose. Le code couleur sera conservé tout au long du rapport, permettant une meilleure lisibilité des résultats.

Notons les différences observables :

- Le profil Eo est composé de 9 pics, soit un de plus que celui d'Eg.
- 5 pics d'intensité supérieure à 25 mAU sont identifiables après 20 min d'analyse chez Eo, contre 0 chez Eg
- Les pics a c et \*Eo possèdent le même RT que 2 5 et \*Eg1, mais une différence de concentration est notable.

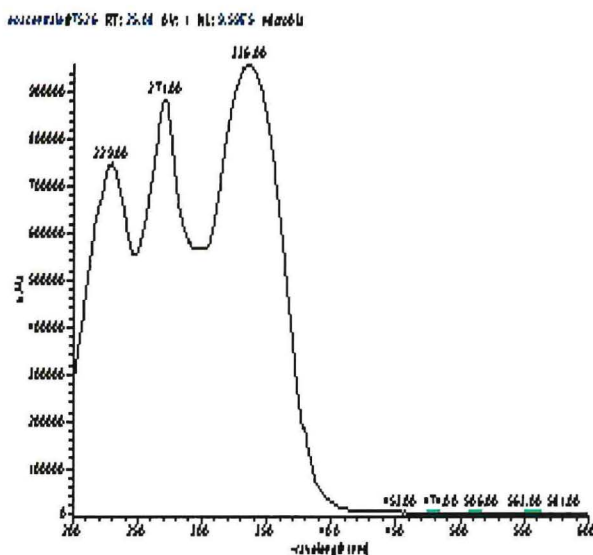
Les pics ont été ensuite analysés par LC-MS (Fig.15) afin de procéder à leur identification.

### 1.3 Identification des pics 1 à 8 et a à i

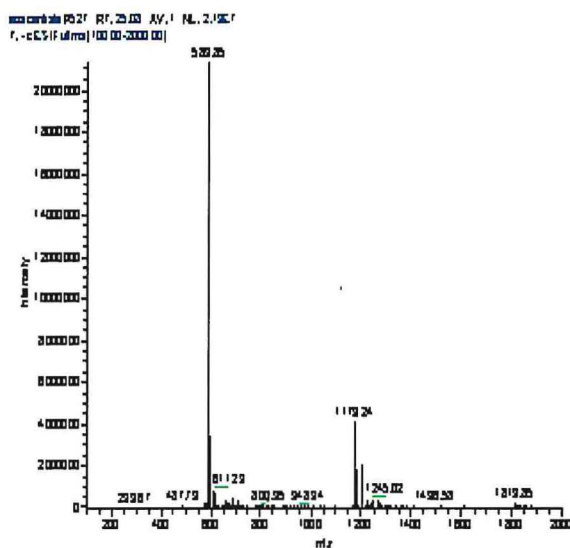
L'identification par LC-MS nous permet d'obtenir un spectre UV et un spectre de masse.

Le spectre d'absorption UV se traduit par le tracé de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde  $A = f(\lambda)$ .

A titre d'exemple, les spectres UV et de masse du pic f sont présentés ci-dessous.



→ Spectre UV de f



→ Spectre de masse de f

Pour chacun des pics diverses données ont été relevées: temps de rétention (RT), maximum d'absorption et m/z. Le tableau 2 présente ces données.

*Tableau 2 : Récapitulatif des données par ordre d'apparition dans le temps*

<b>RT</b>	<b><math>\lambda</math> max</b>	<b>m/z</b>	<b>Pics</b>
16	272/330	593.21	<b>1</b>
17.20	241.2/324.4	341	<b>a</b>
17.91	272/336	563.21	<b>2</b>
18.26	272/350	609	<b>3</b>
18.90	272/350	609	<b>4</b>
19.50/20.02	270.5/350	593	<b>b</b>
20.55	269.1/335.8	593	<b>5</b>
21.04	271/336	593	<b>6</b>
21.11	269/337	578	<b>c</b>
21.90	269/336	431	<b>*Eg1</b>
22.43	272/333	707.19	<b>*Eg2</b>
22.48	232/270/336	578	<b>*Eo</b>
23.95	202/351/340.4	589	<b>d</b>
24.76	270/336.7	577	<b>7</b>
24.90	270.7/336.5	463	<b>e</b>
25.09	271.2/336.5	589.85	<b>f</b>
25.38	245.7/334.8/344.4	575.20	<b>8</b>
25.77	269/340	589.77	<b>g</b>
26.47	234/271/329	783.84	<b>h</b>
27.02	271.7/327.5	753.44	<b>i</b>

#### 1.4 Détermination des molécules potentiellement responsable de la résistance à la mineuse

##### a) Etablissement des chromatogrammes pour tout le matériel végétal adulte

Pour tout les matériels adultes une analyse détaillée des profils chromatographiques ont été effectuée. Pour chaque plant, une recherche de tous les pics précédemment présentés dans le tableau 2 a été réalisée. La présence de la molécule est notée par une croix dans le tableau suivant.

	1	2	3	4	5	6	*Eg1	*Eg2	7	8	a	b	c	*Eo	d	e	f	g	h	i
Eo (A.C)											x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eg (LM)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
Hybrides																				
Hyb1	x	x	x	x	x						x	x	x	x		x	x	x	x	x
Hyb2	x	x			x							x	x	x	x	x	x	x	x	x
Hyb3	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x			x	x		
Hyb4	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x			x	x		
Hyb5	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x		
Hyb6	x	x		x	x			x			x	x	x	x	x		x	x	x	x
Hyb7	x	x		x	x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BC1 à tendance morphologique Eo																				
34.24	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x								
18.3	x	x	x		x				x			x	x	x				x	x	
21.22	x	x	x		x						x	x	x	x		x	x	x		
27.22	x	x	x		x				x			x	x	x				x	x	
54.12	x				x							x		x		x	x	x		
BC1 à tendance morphologique Eg																				
34.23	x	x	x	x	x			x	x	x		x	x	x		x				
18.2	x	x	x	x	x				x		x	x		x	x			x	x	
21.23	x	x	x	x	x	x								x						
27.23	x	x	x	x	x			x	x			x	x	x	x					
54.11	x	x	x	x	x				x			x	x	x	x	x	x	x		

Dans ce tableau sont présentés les résultats des études chromatographiques de trois types de palmiers : les hybrides, les BC1 à tendance morphologique Eo c'est-à-dire ressemblant visuellement à un Eo, et les BC1 à tendance morphologique Eg.

- les hybrides : possèdent la plupart des pics Eo et Eg
- BC1 à tendance morphologique Eo : à l'exception de 34.24, ces BC sont composés de 75 % des pics Eo et de 25 % des pics Eg. Aucun ne contient les pics d h et i.
- BC1 à tendance morphologique Eg : ils se composent majoritairement de 60 % de pics Eg et 40 % de pics Eo. Aucun ne contient \*Eg1, h et i, et seulement deux BC possèdent f et g.

La participation des pics **f g h i** dans la résistance à la mineuse semble être une possibilité au vu de leur absence chez le parent **Eg**, et chez la plus part des BC1 à tendance morphologique **Eg**. Cette hypothèse doit être vérifiée ; pour cela, l'utilisation de la recherche par ion sélectifs est employée.

### b) Recherche par ion sélectif

La recherche par ion sélectif dans un chromatogramme permet de déterminer la présence ou l'absence d'une molécule d'une masse donnée.

Les masses des pics **a à i** d'un parent **Eo** sont recherchées dans un extrait de Lomé.

Les résultats des masses de **a à i** sont donnés dans le tableau suivant :

*Tableau 3 : Récapitulatif des résultats issus de la recherche de molécule par ion sélectif*

Pics	Présence	Etat de trace
a	x	
b	x	
c	x	
*Eo	x	
d		x
e	x	
f		x
g		x
h		x
i		x

Les molécules **a, b, c, \*Eo** et **e** sont présentes dans l'extrait de **Eg**. Elles ne sont pas visibles sur le chromatogramme car elles sont en quantité faible et ont des RT identiques à certaines des molécules présentes chez **Eg**. Seuls les pics **d f g h** et **i** sont spécifiques à **Eo**.

D'après les résultats des analyses des BC1 à tendance **Eg**, certains BC possèdent les pics **d, f** et **g**. Une comparaison des intégrations (aire sous pics) de ces molécules est donc nécessaire afin de déterminer les molécules responsables de la résistance vis-à-vis de la mineuse.

### c) Aire sous pic

L'intégration des pics est présentée dans le tableau suivant pour les pics **f g h** et **i**. Le pic **d** n'est pas donné car il n'est présent que sous forme de trace.

	f (mAU)	g (mAU)	h (mAU)	i (mAU)
Eo (parent)	127.20	117.34	99.15	46.93
Hyb1	96.26	90.19	46.9	10.15
Hyb2	18.81	19.08	8.7	1.5
Hyb3	65.64	65.29		
Hyb4	58.31	57.23		
Hyb5	70.13	63.16		
Hyb6	95.62	96.10	46.10	3.6
Hyb7	127.82	135.82	27.62	
18.3	20.32	24.69		
21.22	69.78	67.97		
27.22	56.08	53.31		
54.12	39.57	51.83		
18.2	15.36	19.05		
21.23	33.60	37.72		
54.11	31.43	35.78		

Un effet de dilution entre les palmiers parents, les hybrides, et les BC1 due à la descendance génétique est notable. Cependant, une comparaison des intensités des pics f et g entre les BC1 à tendance Eo et les BC1 à tendance Eg (sauf exception de BC 18.3) peut être faite. La concentration du pic f chez Eg représente 51 % de celle Eo et 46 % pour g.

### 1.5 Conclusion

Remarquons que les pics **f g h** et **i** sont spécifiques à Eo et donc non présents chez les palmiers *guineensis* sensibles aux attaques de mineuses. De plus ils sont généralement absents chez les BC1 à tendance morphologique Eg.

**Les pics f, g et accessoirement h et i sont donc présumés avoir un rôle dans la résistance du palmier à huile vis-à-vis de la mineuse.**

## 2. Analyse du matériel issu de pépinière

Les plants en pépinière qu'ils soient de type Eg, Eo, Hyb ou BC, ne sont jamais attaqués par la mineuse. Pourquoi ?

- (1) Problème d'appétence de l'insecte ?
- (2) Champ de vision restreint ?
- (3) Présence des acteurs de la résistance chez tous les jeunes plants ?

Pour répondre à ces hypothèses, du matériel issu de pépinière (âgé de 1 à 2 ans) a été envoyé depuis le Bénin.

## 2.1 Tableau de profil chromatographique

Pour le matériel jeune, une analyse détaillée des profils chromatographiques a été effectuée. Pour chaque plant, une recherche de tous les pics présentés dans le tableau 2, a été réalisée.

	1	2	3	4	5	6	*Eg	*Eg2	7	8	a	b	c	*Eo	d	e	f	g	h	i
Jeune plant parent Eo																				
PO 8447	x	x	x	x	x	x	x	x									x	x		
PO 8351											x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PO 8277											x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PO 9057		x	x								x	x	x	x		x	x	x	x	x
PO 8877	x		x	x							x	x	x	x		x	x	x	x	x
PO 9010											x	x	x	x			x	x	x	x
Jeune plant parent Eg																				
PO 8424	x	x	x	x	x	x	x	x										x		
PO 8220	x	x	x	x	x	x	x	x									x	x		
PO 8261	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							x	x		
PO 9046	x	x	x	x	x	x	x	x									x	x		
PO 9002	x	x	x	x	x		x	x			x			x			x			
PO 9029	x	x	x	x	x	x	x	x									x	x		
Back cross 2																				
06/2	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x						x	x		
05/9	x	x		x	x	x	x	x			x	x					x	x		
05/4	x	x	x	x	x	x	x										x	x		
PO 9050	x	x	x	x	x	x	x	x		x							x	x		
PO 8793	x	x	x				x	x		x	x	x	x	x			x	x		
PO 8919	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x			x	x		

Les pics f et ou g sont retrouvés chez tous les parents ; que ce soit Eo ou Eg et chez tous les BC2, ce qui fait penser qu'il y a un arrêt de la synthèse de ces molécules au cours de la croissance chez les arbres guineensis et chez les BC guineensis.

Si f et g sont responsables de la résistance vis-à-vis de la mineuse, leur présence dans les jeunes plants peut expliquer l'absence d'attaque de l'insecte dans les pépinières. Ceci tant à prouver que c'est l'hypothèse 3 qui semble la plus plausible.

## 2.2 Aire sous pic

L'étude de l'intégration des pics chromatographique permet de comparer les espèces

	f (mAu)	g (mAu)	h (mAu)	i (mAu)
PO 8447	86.663	76.250		
PO 8351	3.313.539	4.415.655	414.790	335.725
PO 8277	2.310.539	4.666.749	1.980.534	457.305
PO 9057	4.141.871	3.962.246	1.024.528	605.540
PO 8877	3.226.152	4.286.804	421.288	85.225
PO 9010	4.237.958	4.300.550	477.135	1.021.814
PO 8424	70.010	100.960		
PO 8220	Trop faible	Trop faible		
PO 8261	153.821	1.181.271		
PO 9046	76.165	570.891		
PO 9002	436.554			
PO 9029	115.730	341.442		
06/2	106.238	560.524		
05/9	413.749	1.012.668		
05/4	338.062	727.078		
PO 9050	57.791	570.891		
PO 8793	Trop faible	539.494		
PO 8919	81.525	496.457		

Notons les différences de concentrations suivantes :

Pour f :

- facteur 20 entre les parents Eo et les parents Eg
- facteur 86 entre les parents Eo et les BC2



Pour g :

- facteur 3 entre les parents Eo et les parents Eg
- facteur 5 entre les parents Eo et les BC2

### 3. Conclusion

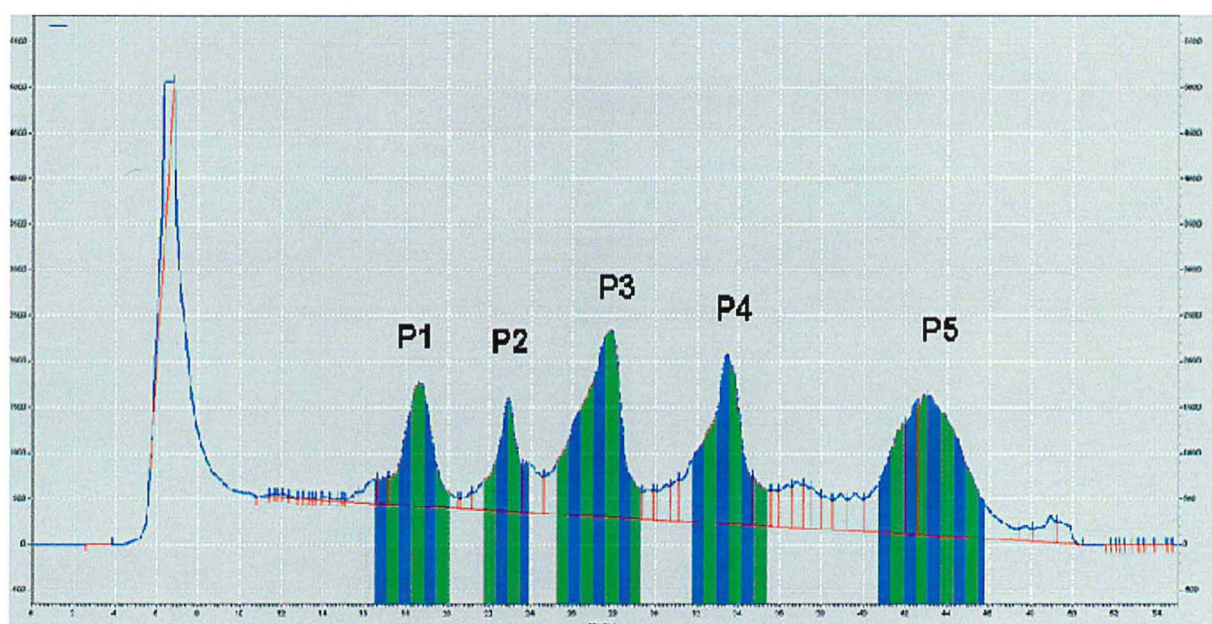
**Les molécules f et g semblent être responsables de la résistance du palmier à huile de type *Oleifera* vis-à-vis du *Coelaenomenodera lameensis*.** La réalisation de tests biologiques est indispensable à la confirmation de ces résultats. Ces tests pourront être réalisés avec de faibles proportions en f et g.

## B. Séparation des composés d'intérêt

Dans cette partie, les pics **f g h** et **i**, potentiellement vecteurs de la résistance vis-à-vis de la mineuse du palmier à huile, font l'objet de purification par HPLC semi-préparative, dans le but de faciliter leur identification.

### 1. Identification des pics collectés

L'injection d'une solution de broyat de feuille de palmier type Eo en HPLC semi-préparative permet d'observer un nouveau type de chromatogramme dû au changement de résolution lié à la colonne 1 (phase 10 microns)



5 fractions majeures ont été repérées à des RT= 18.800, 23.00, 28.00 et 43.200. Elles seront nommées de P1 à P5. Afin de connaître le contenu des fractions P1 à P5 récoltées, des injections individuelles en HPLC analytique ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

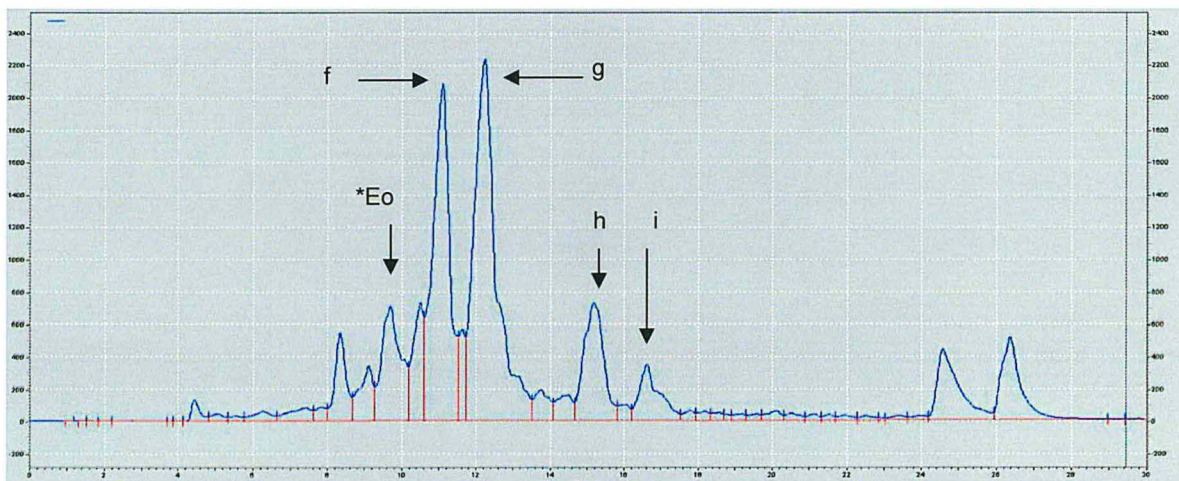
	<b>B</b> (mAU)	<b>*Eo</b> (mAU)	<b>f</b> (mAU)	<b>g</b> (mAU)	<b>h</b> (mAU)	<b>i</b> (mAU)
P1	<b>27.14</b>	8.49	13.54	5.24		
P2		<b>45.5</b>	15.66	11.14		
P3			<b>40.21</b>	<b>49.22</b>	10.28	
P4					<b>20.02</b>	<b>6.65</b>
P5	-	-	-	-	-	-

Les fractions P3 et P4 sont les plus intéressantes, car ce sont elles qui contiennent les pics d'intérêt **f g h** et **i**.

Les fractions d'intérêt P3 et P4 font ensuite l'objet d'une nouvelle purification (colonne 2).

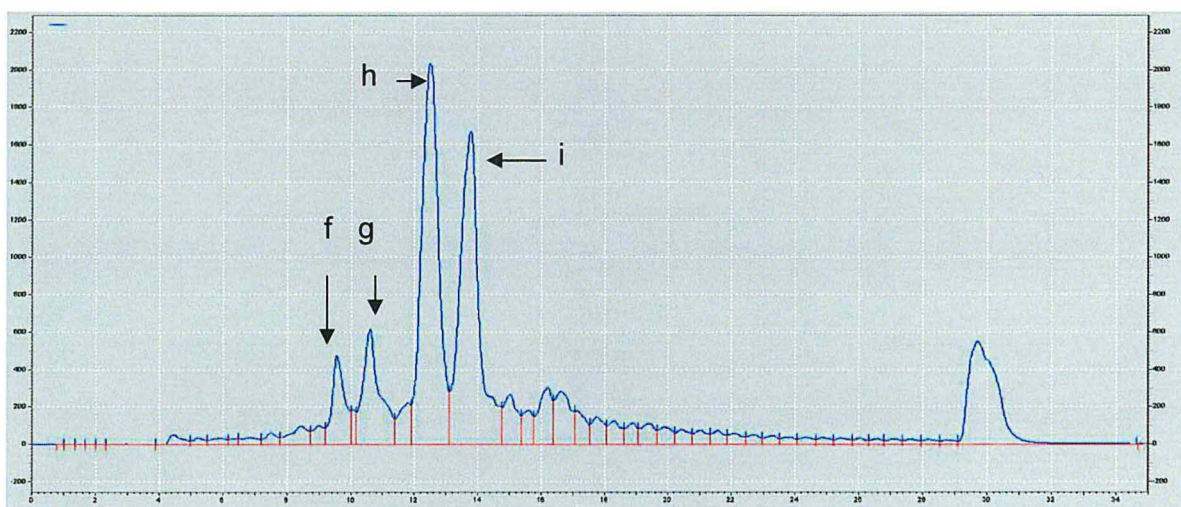
## 2. Séparation des pics d'intérêt 1 à 1

A titre d'exemple, le chromatogramme ci-dessous représente la fraction P3 concentrée.



Dans la fraction P3 comme nous le montre le tableau précédent, les pics **f** et **g** sont majoritaires. Les pics **f g h** et **i** ont été collectés individuellement en vue d'analyse ultérieures sur les composés purifiés.

### Chromatogramme pour la fraction P4 concentrée



La fraction P4 montre les pics **h** et **i** avec une séparation plus précise. Une collecte individuelle est donc effectuée.

## C. Analyse des molécules d'intérêt

Les pics **f g h** et **i**, précédemment identifiés comme étant potentiellement responsables de la résistance vis-à-vis de la mineuse, ont été séparés, collectés, concentrés puis injectés en mode infusion dans le spectromètre de masse afin d'être analysés.

### 1. Résultat de l'infusion

Des analyses MS/MS de chaque molécule sont réalisées afin de connaître les différents fragments.

MS	MS1	MS2	MS3	$\Delta$
<b>F= 589</b>	445			144
	487			102
	413			176
	<b>487</b>	325		162
		427		60
		445		42
		<b>427</b>	337	90
			366	61
			409	18
<b>G= 589</b>	527			62
	487			102
	445			144
	413			176
	<b>527</b>	445		82
		427		100
		325		202
	<b>445</b>	325		120
<b>H= 783</b>	413			370
	577			206
	663			120
	591			192
	<b>413</b>	293		120
		337		76
		365		48
<b>I= 753</b>	577			176
	413			340
	311			442

#### Remarque :

**F** et **g** sont à priori deux molécules de structure voisine, leur masse, leur spectre UV et leur fragmentation étant identiques.

Dans chaque fragmentation un ion fils à  $m/z = 413$  est retrouvé. Les 4 molécules **f g h** et **i** sont donc supposées faire partie de la même famille et ont donc une structure de base identique.

Le  $\Delta$  176 est retrouvé pour les molécules **f** **g** et **i**. 176 est donc un fragment commun.

Nous pouvons donc établir les équations suivantes :

$$f = 589 = 413 + 176$$

$$g = 589 = 413 + 176$$

$$h = 783 = \underbrace{(413 + 164)}_{577} + \underbrace{206}_{(176 + 30)}$$

$$i = 753 = (413 + 164) + 176$$

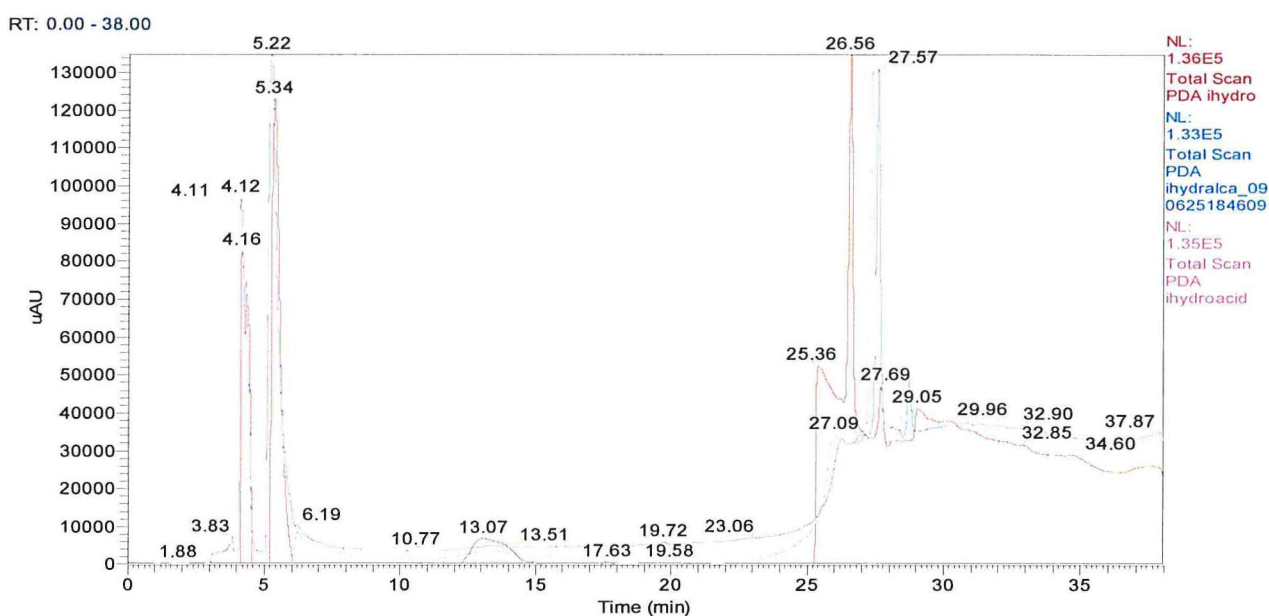
## 2. Hydrolyse

Afin de connaître les différents types de liaison qu'il existe au sein même des molécules, le composé **i**, molécule complexe, a été soumis aux hydrolyses acide et alcaline.

L'hydrolyse alcaline permet de couper les liaisons ester. L'hydrolyse d'une liaison ester permet de transformer la molécule sous sa forme acide carboxylique ( $-\text{COOH}$ ) en éliminant une molécule d'eau.

Par hydrolyse acide il y a coupure des liaisons glycosidiques qui ont lieu entre 2 groupes  $-\text{OH}$  et 2 monosaccharides avec élimination d'une molécule d' $\text{H}_2\text{O}$

L'échantillon hydrolysé est injecté en LC-MS ainsi qu'un échantillon témoin n'ayant subi aucune hydrolyse. Une comparaison des chromatogrammes est donc nécessaire afin de connaître les différentes liaisons intra-moléculaires.

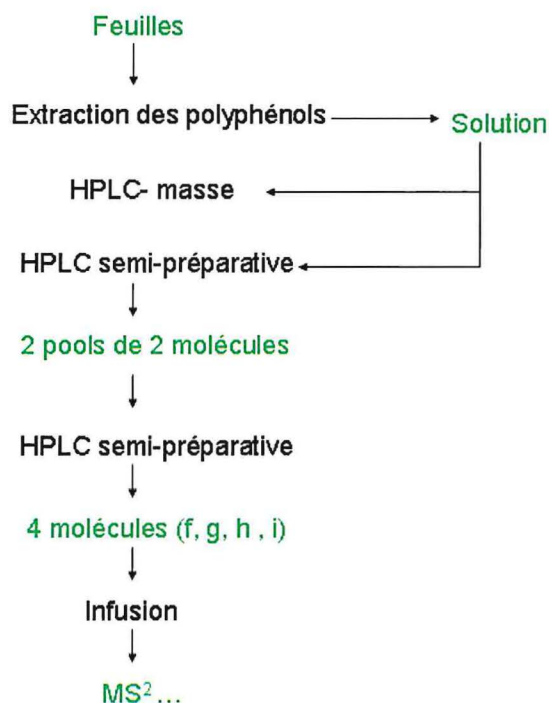


Les chromatogrammes des 3 échantillons sont identiques. Les deux hydrolyses n'ont donc pas eu d'effet sur la fraction testée. Il n'y a donc pas de liaison ester ni glycosidique au sein de la molécule i. F g et h ayant potentiellement la même structure de base, ne seront pas testées mais seront supposés donner le même résultat.

**Dans mon contrat avec le Cirad, la clause de confidentialité ne me permet pas de divulguer les résultats finaux obtenus.**

## V. Synthèse

L'huile de palme et de palmiste sont issues de l'espèce de palmier *Elaeis guineensis*, sensible à la mineuse. Les attaques de mineuse peuvent réduire de 60 % la productivité d'un arbre. Seule l'espèce *Elaeis oleifera* est résistante à ce coléoptère. Cette résistance est peut être due à la présence de 4 molécules notée **f g h** et **i** qui ont été isolées et analysées à partir de feuille de palmier de type *oleifera*.



Les caractéristiques de ces molécules sont présentées dans le tableau suivant :

	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>	<b>i</b>
<b>m/z</b>	589	589	783	753
<b>Spectre UV</b>	229/271/336	228/269/340	234/271/329	237/272/327
<b>Fragmentation</b>	487, 445, 427, 409, 366, 337, 325, 413, 176, 162, 144, 102, 90, 60, 42, 18	Cf. fragmentation de f	663, 591, 577, 413, 370, 365, 337, 206, 192, 120, 76, 48	577, 442, 413, 311, 176 (...)

Chacun de ces composés ont été isolés, purifiés et concentrés à partir de feuilles de palmier Eo Brésil et Eo Amérique Centrale.

Afin d'obtenir une structure précise de ces molécules, une demande de RMN a été effectuée.

# Lexique

**Blanchiment** : Traitement thermique consistant à transformer le produit par la chaleur souvent par immersion dans l'eau ou vapeur d'eau. La durée varie selon la technique, le produit, la grosseur ou l'état de maturité. Les intérêts d'un tel traitement sont :

- Limiter ou inactiver l'altération enzymatique
- Limiter les risques d'oxydation
- Aviver la couleur
- Assainir le produit

**Colonne** : Tube construit dans un matériau le plus inerte possible aux produits chimiques, soit en inox soit en verre. Sa section est constante de diamètre pouvant aller de 4 à 20 mm pour des longueurs de 15 à 30 cm. Elle est remplie de phase stationnaire permettant la séparation de différents composés selon la nature des phases (liquide-solide, liquide-liquide, liquide-gel, phase greffées) et selon la nature des phénomènes mis en jeu dans la séparation (ici : chromatographie d'échange d'ions).

**Détecteur UV-Visible** : Appareil mesurant l'absorption en sortie de colonne.

**Diptère** : Ordre d'insecte regroupant entre autre, des espèces désignées par des noms vernaculaires de mouche, moustique, taons...

**Electronébulisation** : Son principe est le suivant : à pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire de silice, métallisé en surface et porté à un potentiel élevé. Le champ électrique intense leur confère une densité de charge importante. Sous l'effet de ce champ et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air co-axial, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvation et d'évaporation. Leur densité de charge devenant trop importante, les répulsions électriques atteignant le niveau des tensions superficielles, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variable.

**Electrovanne** : Dispositif permettant d'autoriser ou d'interrompre par une action mécanique la circulation d'un fluide dans un circuit.



**Fragmentation :**

**Ganoderma :** Champignon tellurique.

**Holométabole :** Se dit d'un insecte chez qui le passage de l'état larvaire à l'état adulte se fait par l'intermédiaire d'un état nymphal.

**HPLC :** Chromatographie Liquide Haute Performance. Technique de séparation analytique et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés.

**Hyménoptère :** Ordre d'insecte comportant des espèces très bénéfiques à l'homme de par leur rôle pollinisateur ou d'auxiliaire de culture. Cependant certaines autres espèces sont des prédateurs de végétaux ou de milieux forestiers

**Imago :** Stade adulte reproducteur, caractérisé par le développement des ailes et de l'appareil génital

**Infusion :** Technique qui permet d'injecter un composé ou mélange de composés directement dans le spectromètre de masse sans passer par la colonne de l'HPLC

**Lépidoptère :** Ordre d'insecte dont la forme adulte est communément appelée papillon.

**Nymphe :** La nymphe représente le stade du développement intermédiaire entre la larve et l'imago lors des mues de métamorphose des insectes holométaboles.

**Pompe :** Partie de l'HPLC qui permet de travailler en haute pression. Elle est composée de :

- 2 pistons alternatifs
- Réservoirs de phase mobile
- Electrovanes
- Amortisseur de pulsation
- Système de purge et d'amorçage
- Capteur de pression.

**Pourriture du cœur :** Dessèchement noir des palmes

**Raffinage** : Traitement de transformation qui a pour but d'éliminer de l'huile brute les impuretés (Acide gras libre, phospholipides, protéines, cires, pigment...) pour produire une huile alimentaire aux propriétés requises telle que le goût, la couleur, la limpidité...

**Source d'ionisation** : Elle permet de vaporiser les molécules et de les ioniser. Elle peut être utilisée soit en mode négatif (comme pour ce projet) pour voir les ions négatifs, soit en mode positif. Il existe plusieurs types de source dont celle que nous utilisons : L'électronébulisation ou électrospray (ESI)

**Spathe** : Grande bractée membraneuse ou foliacée enveloppant plus ou moins une inflorescence, et ouverte latéralement par une fente.

**Spectrométrie de masse** : Elle comporte une source de ionisation, suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport  $m/z$ , d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports  $m/z$  des ions détectés en abscisse et l'abondance de ces ions selon l'axe des ordonnées.

**Spectromètre de masse** : Appareil physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique. Il permet également de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant.

**Stipe** : Nom donné au tronc des palmiers. Le stipe n'est pas un véritable tronc, il se caractérise principalement par l'absence de croissance en épaisseur, contrairement aux troncs des arbres dicotylédones.

## Récapitulatif des figures et tableaux

Fig.1 : Le cirad dans le monde

Fig.2 : Huile de palme artisanale

Tableau 1 : Les productions mondiales d'huiles végétales en 2005

Fig.3 : Photo d'*Elaeis guineensis*

Fig.4 : Représentation schématique d'une palme

Fig.5 : Inflorescence mâle et inflorescence femelle de palmier à huile

Fig.6 : Infructescence et coupe longitudinale d'un fruit de palmier à huile

Fig.7 : Dégâts réalisés par une mineuse

Fig.8 : Schématisation de l'anatomie des coléoptères

Fig.9 : Photo de *Coelaenomenodera lameensis*

Fig.10 : Tableau récapitulatif des différentes classes de polyphénols

Fig.11 : Biosynthèse des polyphénols

Fig.12 : Photo d'un manchon posé sur une feuille de palme à Pobé (Bénin)

Fig.13 : Représentation schématique des différents organes composant une HPLC

Fig.14 : Carte de la distribution des *Elaeis guineensis* dans le monde

Fig.15 : Représentation schématique du dispositif LC-MS

Tableau 2 : Récapitulatif des données par ordre d'apparition dans le temps

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats issus de la recherche de molécules par ion sélectifs

## Littérature

Alassane COFFI, Formation sur les analyses des polyphénols, Mtp CIRAD, 2008, 11p

Berti N & Mariau D, « *Coelaenomenodera lameensis* n. Sp., ravageur du palmier à huile (Coleoptera, Chrysomelidae) », *Nouv.revue Ent. (NS)*, Paris, septembre 1999, p.253-267

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Col%C3%A9opt%C3%A8re>

<http://webbook.nist.gov/chemistry/mw-ser.html>

Mariau D, Gestion des populations de *Coelaenomenodera lameensis* Bert et Mariau en vue de la mise au point d'une stratégie de protection raisonnée, Mtp CIRAD, 2001, 236p

Mariau D, La faune du palmier à huile et cocotier, les bibliographies du CIRAD, Montpellier, 2000, 97p

Michodjehoun-Mestres L, Amraoui W, Brillouet J.M, “ Isolation, Characterization, and Determination of 1-O-trans-Cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranos in the Epidermis and Flesh of developing Cashew Apple (*Anacardium occidentale* L.) and Four of its Genotypes ” *J.Agric.Food Chem*, 2009, 57, 1377-1382, 1377

Potier F., Amélioration génétique du palmier à huile, création variétale et certification, CIRAD, Février 2006, 80 diapositives.

Rosset R. Caude M. & Jardy A., Manuel pratique de chromatographie en phase liquide, Masson, Paris Milan Barcelone Mexico, 1990, 370 p

### **Résumé :**

Les productions africaines d'huile de palme issue d'*Elaeis guineensis* sont réduites de 60% du fait de la présence d'un insecte mineur, *Coelaenomenodera lameensis*. Une espèce de palmier non productive, *Elaeis oleifera*, résiste aux attaques de cet insecte.

Quatre molécules potentiellement actrices de la résistance ont été détectées, isolées, purifiées et concentrées via différentes techniques de chromatographie. Ces quatre composés de feuilles d'*Elaeis oleifera*, noté f g h et i sont en cours d'identification et feront l'objet d'un autre projet.

**Mots clés :** Huile de palme, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, *Coelaenomenodera lameensis*, chromatographie.

### **Abstract:**

African oil palm production of *Elaeis guineensis* are reduced by 60% by the presence of minor insect, *Coelaenomenodera lameensis*. Non productive palm specie, *Elaeis oleifera*, resist at these attacks.

Four molecules potentially protagonists of the resistance have been detected, isolated, cleansed and concentrated via various chromatography techniques. These four leaf compounds of *Elaeis oleifera* are in course of identification and will be the object of another project

**Keys words:** Oil palm, *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*, *Coelaenomenodera lameensis*, Chromatography.