



HAL
open science

Formulations écocompatibles d'extraits de l'algue verte Ulva Lactuca pour la préservation des agrumes après récolte

Douaa Salim

► To cite this version:

Douaa Salim. Formulations écocompatibles d'extraits de l'algue verte Ulva Lactuca pour la préservation des agrumes après récolte. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université Libanaise. Faculté des Sciences (Beyrouth, Liban), 2019. Français. NNT : 2019INPT0128 . tel-04169815

HAL Id: tel-04169815

<https://theses.hal.science/tel-04169815v1>

Submitted on 24 Jul 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

Mme DOUAA SALIM

le jeudi 12 décembre 2019

Titre :

Formulations écocompatibles d'extraits de l'algue verte *Ulva Lactuca* pour
la préservation des agrumes après récolte

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

Directeur(s) de Thèse :

MME PASCALE DE CARO

MME ASMA CHBANI

Rapporteurs :

M. CEDRIC BERTRAND, UNIVERSITE DE PERPIGNAN

M. MARC EL BEYROUTHY, UNIVERSITE SAINT-ESPRIT DE KASLIK

Membre(s) du jury :

M. FAWAZ EL OMAR, UNIVERSITE LIBANAISE, Président

M. CHAKER EL KALAMOUNI, UNIVERSITE DE LA REUNION, Membre

Mme ASMA CHBANI, UNIVERSITE LIBANAISE, Membre

Mme PASCALE DE CARO, TOULOUSE INP, Membre



Thèse en Cotutelle

Pour l'obtention du grade de Docteur délivré

par L'Université de Toulouse -Institut National Polytechnique de Toulouse

(Ecole Doctorale SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse)

Spécialité : **Sciences des Agroressources**

et

par L'Université Libanaise (Ecole Doctorale Sciences et Technologie)

Spécialité : **Biotechnologies Appliquées**

Présentée et soutenue publiquement par

SALIM Douaa

Le 12 Décembre 2019

**Formulations éocompatibles d'extraits de l'algue verte *Ulva lactuca* pour la
préservation des agrumes après récolte.**

Membre du Jury

M. Cédric Bertrand , Professeur, Université de Perpignan	Rapporteur
M. Marc El Beyrouthy , Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik	Rapporteur
M. Chaker El kalamouni , Maître de conférences, Université de La Réunion	Examineur
M. Fawaz El Omar , Professeur, Université Libanaise	Examineur
Mme Pascale De Caro , Maître de conférences, Toulouse INPT	Directrice de Thèse
Mme Asma Chbani , Professeur, Université Libanaise	Directrice de Thèse

Dédicace

Je dédie ce travail

A l'âme de ma grande mère « Teta Fufu ».

A mes parents,

qui ont tout sacrifié pour me voir réussir.

Vous êtes la source de mes efforts et la flamme de mon cœur.

A mes frères, ma sœur et mon amour

Vous êtes la lumière de mes jours, mon soutien moral, source de joie et de bonheur.

Vous m'avez toujours aidée et encouragée durant tout le chemin.

Douaa

Remerciements

Nous y sommes, on est arrivé... Me voilà au bout de cette thèse qui a marqué ma vie avec ses hauts et ses bas, ses rires et ses larmes, ses bonheurs et ses stress, ses rencontres et ses départs. L'ensemble a constitué la meilleure expérience enrichissante et formidable de ma vie dans laquelle j'ai tellement appris et découvert. Ceci n'aurait pas été possible sans toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à ce travail de thèse, c'est avec ces quelques lignes que je vous exprime ma reconnaissance.

Je tiens tout d'abord à remercier les professeurs Cédric Bertrand et Marc El Beyrouthy pour avoir accepté de rapporter et d'évaluer mon travail de thèse, ainsi que pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à cet égard. Je remercie aussi Pr. Fawaz El Omar et Dr. Chaker El Kalamouni qui m'ont fait l'honneur de participer au jury en tant qu'examineurs.

Je tiens à exprimer mon immense gratitude envers mes directrices de thèse Mesdames Asma Chbani et Pascale de Caro. J'ai beaucoup appris à vos côtés et les mots me manquent pour vous exprimer ma gratitude. Vous avez été particulièrement disponibles et consciencieuses durant tout mon travail de thèse. Merci pour votre soutien, votre encouragement et pour votre patience et vos conseils menant toujours aux meilleures solutions.

Mes vifs remerciements à Dr. Asma Chbani, qui m'a choisi pour réaliser cette thèse avec elle. Un grand merci pour son inestimable soutien, ses encouragements précieux et à la confiance qu'elle a su me témoigner pendant ces trois années de thèse. Je vous remercie de bon cœur pour toutes vos qualités humaines.

Mes vifs remerciements à Dr. Pascale De Caro, vous avez été toujours accessible et prête à répondre à toutes mes questions tout au long de ces trois années. Depuis mon arrivée à Toulouse, vous m'avez attribué une confiance immense et vous m'avez bien guidé pour mener à terme mes travaux de recherche. Merci pour votre accueil chaleureux au LCA, pour votre persévérance et votre franchise, votre écoute et vos conseils.

Je remercie fortement aussi les membres de l'équipe de Biotechnologie Appliquée dirigée par Dr. Hiba Mawlawi, qui ont rendu le travail au laboratoire plus facile. Je tiens à remercier

particulièrement la plus belle assistante « Rayuna » pour son écoute, son attention et sa capacité à régler tous les soucis rencontrés pour fournir un bon déroulement du travail au laboratoire.

Je tiens à remercier aussi tout le personnel du Laboratoire LCA à Toulouse, Monsieur Carlos Vaca-Garcia, directeur adjoint du LCA, les enseignant-chercheurs, les doctorants, les techniciens et les stagiaires. C'était un grand plaisir de vous connaître.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis, spécialement Sidrine, Huy, Gabi, Alé, Nicki, Tousaint, khouloud, Clément, Francisco, qui m'ont apporté leur support moral. Un très grand merci à Issaad pour sa confiance et son support inestimable. Tu es plus qu'une amie, tu es une sœur et un soutien dans les moments pénibles et agréables. Mon séjour à Toulouse n'aurait pas été le même sans ta présence.

Une pensée particulière à mes belles amies, Khadija, Hiba, Fatima, Rayan, Reem, Manal, Bariaa et Sara, pour leurs encouragements réguliers, leur merveilleuse sincérité, leur fidélité exceptionnelle et leur présence inestimable à côté de moi aux bons et mauvais moments.

Enfin, ma reconnaissance et mes remerciements les plus distingués vont à ma famille qui a garni mes chemins avec espoir, lumière et amour. Merci à papa, pour tout ce qu'il a fait et continue de faire chaque jour. Merci à la plus belle perle du monde, mon ange "Maman", pour sa tendresse inépuisable, son amour en or, ses sacrifices infinis, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Un grand merci à mes formidables frères, ma sœur, qui n'ont pas cessé un jour à me soutenir pendant tous les moments difficiles, merci pour leur tendresse, leur main-tendue et leur écoute pleine de respect. Merci à « Mahmudi », l'amour de ma vie, qui a partagé avec moi tous les moments de bonheur et de galère. Merci de me remonter le moral à chaque fois que je suis fatiguée, à m'encourager quand je baisse les bras, et surtout d'être toujours là pour moi, même lorsque des milliers de miles nous ont séparés. C'est à vous tous que je dédie ce mémoire, qui est le fruit de leur amour, leurs encouragements et sacrifices.

Douaa

Résumé

La culture des agrumes est l'une des plus répandues, dans les pays méditerranéens. Cependant, ces agrumes sont exposés à de nombreuses maladies post-récolte, généralement causées par le pathogène « *Penicillium digitatum* ». Plusieurs fongicides chimiques utilisés pendant des décennies, se sont révélés nocifs pour la santé et l'environnement. Le contexte sociétal et réglementaire évoluant, de nouvelles stratégies sont envisagées pour tendre vers des solutions plus sûres. C'est pourquoi, les travaux visent à développer un biopesticide utilisant les molécules naturelles issues d'une algue verte pour la protection des agrumes. Or, l'action des molécules actives dépend de la méthode de formulation.

Les algues vertes *Ulva lactuca* sélectionnées pour cette étude sont présentes en abondance sur les zones côtières Libanaises. Plusieurs extraits ont été réalisés par macération à l'aide de solvants verts (eau, éthanol, acétate d'éthyle) pour obtenir différentes compositions en métabolites secondaires. Parmi ces molécules lipophiles ou hydrophiles, certaines sont à l'origine de l'activité anti-fongique détectée pour les extraits. Le mécanisme d'action des fractions actives (extraits bruts et chlorophylles isolées) sur *P. digitatum* a été étudié en mesurant l'activité des enzymes de défense des cellules des agrumes. Les enzymes β -1,3-glucanase et peroxydases ont été identifiées comme étant responsables de la dégradation de la paroi cellulaire fongique. De plus, afin de préserver l'activité des extraits aqueux pendant plusieurs mois, une microencapsulation par atomisation a été réalisée à l'aide de biopolymères.

Afin de limiter la consommation en molécules actives et de faciliter leur adhérence à la surface des fruits, l'extrait aqueux d'*Ulva lactuca* a été formulé sous forme d'une émulsion huile-dans-eau. Pour cela, des émulsifiants biosourcés ont été synthétisés en respectant les principes de la chimie verte. Le caractère amphiphile de ces aconitates ayant été mis en évidence, ils se sont avérés capables de stabiliser une émulsion contenant l'extrait aqueux d'*Ulva lactuca*. Plusieurs tests microbiologiques ont montré l'efficacité des nouveaux ingrédients (fraction aqueuse et agent émulsifiant) vis-à-vis de la multiplication, de l'adhésion et de la germination du *Penicillium digitatum*. Ainsi, la mise en émulsion de l'extrait aqueux optimise son activité anti-fongique, en assurant une diffusion homogène des molécules actives vers la surface à traiter, puis en formant un film d'huile protecteur. Enfin, des tests *in vivo* sur 6 semaines ont montré que les émulsions et l'extrait aqueux permettent de réduire de façon importante le taux d'infection des oranges.

En conclusion, ces travaux proposent des ingrédients naturels ou biosourcés mis en œuvre par des procédés écocompatibles pour apporter une solution alternative à la conservation des agrumes après récolte.

Mots clés : *Ulva lactuca*, extraction, solvant vert, émulsifiant biosourcé, activité anti-fongique, contrôle post-récolte.

Abstract

Citrus cultivation is one of the most widespread in the Mediterranean countries. However, these citrus fruits are exposed to many post-harvest diseases, usually caused by the pathogen "*Penicillium digitatum*". Several chemical fungicides used for decades have proven to be harmful to health and the environment. With the societal and regulatory context evolving, new strategies are being considered to move towards safer solutions. Therefore, the work aims to develop a biopesticide using natural molecules from a green alga for the protection of citrus fruits. However, the action of the active molecules depends on the method of formulation.

The *Ulva lactuca* green algae selected for this study are abundant in the Lebanese coastal areas. Several extracts were made by maceration with green solvents (water, ethanol, ethyl acetate) to obtain different compositions of secondary metabolites. Among these lipophilic or hydrophilic molecules, some are at the origin of the anti-fungal activity detected for the extracts. The mechanism of action of active fractions (crude extracts and isolated chlorophylls) on *P. digitatum* was studied by measuring the activity of the defense enzymes of citrus cells. The enzymes β -1,3-glucanase and peroxidases have been identified as being responsible for fungal cell wall degradation. In addition, in order to preserve the activity of the aqueous extracts for several months, microencapsulation by atomization was carried out using biopolymers.

In order to limit the consumption of active molecules and to facilitate their adhesion to the fruit surface, the aqueous extract of *Ulva lactuca* was formulated in the form of an oil-in-water emulsion. For that, biosourced emulsifiers were synthesized respecting the principles of green chemistry. The amphiphilic character of these aconitates gives them, the ability to stabilize an emulsion containing the aqueous extract of *Ulva lactuca*. Several microbiological tests showed the effectiveness of the new ingredients (aqueous fraction and emulsifying agent) towards the multiplication, adhesion and germination of *Penicillium digitatum*. Thus, the emulsification of the aqueous extract optimized its anti-fungal activity, ensuring a homogeneous diffusion of the active molecules to the surface to be treated, then forming a protective vegetable oil film. Finally, in vivo tests over 6 weeks indicated that emulsions and aqueous extract can significantly reduce the infection rate of oranges.

In conclusion, this work proposes natural or biobased ingredients implemented by eco-compatible processes to provide an alternative solution to citrus fruit postharvest preservation.

Keywords: *Ulva lactuca*, extraction, green solvent, biosourced emulsifier, antifungal activity, postharvest control.

Valorisation scientifique dans le cadre strict de la thèse

Publications

Douaa Salim, Pascale de Caro, Othmane Merah, Asma Chbani. Control of postharvest citrus green mold using *Ulva lactuca* extracts as a source of active substances. *Horticulturae*, 2019, Submitted.

Douaa Salim, Rayane Chahal, Josephine Al Alam, Maya Rima, Othmane Merah, Asma Chbani, Pascale de Caro. *Ulva lactuca* induces defense responses against *Penicillium digitatum*; postharvest green mold on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 2019, Submitted.

Douaa Salim, Pascale de Caro, Vanessa Durrieu, Asma Chbani. Anti-fungal activity of microencapsulated aqueous extracts from *Ulva lactuca*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2019, Submitted.

Douaa Salim, Pascale de Caro, Asma Chbani, Xavier Chasseray, Alain Shum Cheong Sing. Green seaweed extract formulated with biobased ingredients for postharvest citrus fruit preservation. *Crop Protection*, 2019, Submitted.

Communications orales

Douaa Salim, Pascale de Caro, Asma Chbani. Élaboration des formulations à base des molécules biosourcées et écocompatibles. 2ème « Forum doctoral » à l'Ecole doctorale des sciences et de la technologie de Beyrouth. September 27, 2017, Beirut-Lebanon.

Douaa Salim, Josephine Al-Alam, Ziad Fajloun, Maurice Millet, Pascale de Caro, Asma Chbani. Green seaweed *Ulva lactuca* and green Plant *Spinacia oleracea* used as biocontrol agents for postharvest citrus fruit. 7th edition CIPAM, International congress on medicinal and aromatic plants. June 25-28, 2018, Toulouse-France.

Douaa Salim, Josephine Al-Alam, Ziad Fajloun, Maurice Millet, Pascale de Caro, Asma Chbani. Comparative Chemical Composition of Green seaweed *Ulva lactuca* and Green High Plant

Spinacia oleracea. 2nd CIMEE, Second International Symposium on Materials, Electrochemistry and Environment. October 18-20, 2018, Tripoli, Lebanon.

Douaa Salim, Pascale de Caro , Asma Chbani , X. Chasseray, A. Shum . Biobased emulsions including platform molecule derivatives for biocontrol applications. The 15th edition of the International Conference on Renewable Resources & Biorefineries. June 3-5, 2019, Toulouse-France.

Communications par affiches

Douaa Salim, Josephine Al-Alam, Ziad Fajloun, Maurice Millet, Pascale de Caro, Asma Chbani. Inhibition of germination of *Penicillium digitatum* conidia by seaweed extracts used as bio control agent for post harvested citrus fruits. 24th International Scientific Conference “Sciences, Social Equity and Sustainable Development”, April 25-26, 2018, Balamand Al Kurah- LEBANON.

Formations

Catégorie : International, Langues :

- ✓ Atelier : « Create your CV in English » : 1 jour (23 avril 2018) PROGRESS - 2 impasse Michel Labrousse - La Maison des lois - 31100 Toulouse

Catégorie : Méthodologie de la thèse recherche documentaire et publication

- ✓ Atelier : « Personnaliser un style bibliographique pour Zotero ou Mendeley avec le codage CSL » : 1 jour (29 mai 2017) Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées - Maison de la Recherche et de la Valorisation (MRV) 118 route de Narbonne
- ✓ Atelier : « Publier dans les revues scientifiques » : enjeux et modalités pratiques à l’heure du numérique - 1 jour (26 janvier 2018) Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées - Maison de la Recherche et de la Valorisation (MRV) 118 route de Narbonne
- ✓ Atelier « Logiciel de traitement de texte professionnel LaTeX » : 3 jours (12 octobre 2017) Agence de la Francophonie (AUF)-Tripoli-Liban.

Catégorie: Poursuite de carrière

- ✓ Atelier « Savoir se présenter en 3 minutes devant un recteur » : 1 jour (08 mars 2018) PROGRESS - 2 impasse Michel Labrousse - La Maison des lois - 31100 Toulouse
- ✓ Atelier « DOCTORIALES » : 6 jours pour préparer les doctorants à intégrer l'entreprise. ALBI (17 juin 2018) Ecole des Mines d'ALBI - allée des sciences - 81000 ALBI

 **Catégorie: Scientifique**

- ✓ Atelier : « Ethique et intégrité scientifique » : 1 jour (29 mai 2018) Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées - Maison de la Recherche et de la Valorisation (MRV) 118 route de Narbonne
- ✓ Atelier : « Preterm Labor Detection » : 1 jour (1 février 2017) Université libanaise- Centre AZM pour la Recherche en Biotechnologie et ses Applications Rue El Mitein, Tripoli, LIBAN

 **Catégorie : Pratiques pédagogiques pour l'Université**

- ✓ Atelier : « Découvrir ce qu'est apprendre pour enseigner plus efficacement » : 1 jour (18 février 2019) Université Fédérale de Toulouse Midi Pyrénées- Maison de la Recherche et de la Valorisation (MRV) 118 route de Narbonne
- ✓ Co-encadrement des étudiantes 3èmes années (projet 3A) avec Dr.Pascale De Caro et Dr. Vanessa Durrieu- (Decembre 2017-Fevrier 2018) ENSIACET-INP/ Toulouse-France

Table des matières

Chapitre 1 : Analyse bibliographique	22
I. Partie 1 :	22
A. Traitement post-récolte des agrumes au Liban	22
1. La production d'agrumes au Liban	22
2. Les Pesticides	24
2.1. Définition	24
2.2. Classification.....	25
2.3- Emploi intensif des pesticides à usage agricole.....	26
2.3.1- Effets sur la santé humaine	26
2.3.2- Effet des pesticides sur l'environnement	26
2.4- Usage des pesticides en France.....	27
2.5- Usage des pesticides au Liban	28
3. Les maladies phytopathogènes	29
3.1. Définition d'une maladie de plante :	29
3.2. Les microorganismes attaquant les agrumes.....	30
3.2.1. <i>Penicillium digitatum</i>	30
3.3. Les approches de lutte contre les agents pathogènes.	31
3.3.1. Traitement thermique.....	31
3.3.2. Traitement chimique	32
3.3.3. Traitement biologique.....	34
3.3.4. Utilisation des biopesticides.....	35
3.3.4.1. Généralités	35
3.3.4.2. Classification des biopesticides.....	36
4. Contexte réglementaire des pesticides et biopesticides	39
5. Utilisation des algues marines comme biopesticides	42
5.1. Généralités sur les algues marines	42
5.1.1. Les algues vertes	43
6. La macroalgue verte <i>Ulva lactuca</i>	44
6.1. Généralités	44
6.2. Localisation géographique au Liban	45
6.3. Composition biochimique.....	46

6.3.1. Les minéraux.....	46
6.3.2. Les pigments.....	48
6.3.3. Les polysaccharides.....	49
6.3.4. Les protéines.....	50
6.3.5. Les lipides.....	51
7. Méthodes de prétraitement et d'extraction appliquées aux algues.....	53
7.1. Généralités.....	53
7.2. Prétraitement de la biomasse d'algues et de la procédure d'extraction.....	54
7.3. Extraction par solvant.....	56
8. Activités biologiques de l'<i>Ulva lactuca</i>.....	57
8.1. Activité anti-oxydante.....	57
8.2. Activité anti-microbienne.....	58
8.3. Activité cytotoxique.....	58
8.4. Activité antifongique.....	58
9. Contrôle post-récolte vis-à-vis de <i>P. digitatum</i>.....	59
9.1. Mécanisme d'action des composés alternatifs aux fongicides dans les agrumes sur <i>Penicillium digitatum</i>	60
9.1.1. Induction des enzymes de défense dans les tissus des agrumes.....	60
9.1.2. Accumulation des espèces réactives oxygénées (ROS).....	62
9.1.3. La perte d'intégrité de la membrane.....	62
9.2. Mécanisme d'action de <i>Penicillium digitatum</i> sur les cellules d'orange.....	64
II. Partie 2 : Procédé de formulation des extraits.....	65
A) Formulation en émulsions végétales.....	65
1. Emulsions végétales.....	65
1.1. Définition générale.....	65
1.2. Types d'émulsion.....	65
1.3. Mécanisme de déstabilisation des émulsions.....	67
1.4. Mécanisme de stabilisation des émulsions.....	69
1.5. Procédés d'émulsification.....	71
1.6. Mesure de la stabilité d'émulsions.....	72
1.7. Capacité émulsifiante d'un tensio-actif.....	74
1.8. Rôle des émulsions.....	75
2. Synthèse des tensioactifs.....	75

2.1. Choix d'une molécule plateforme.....	75
2.1.1. Acide citrique :.....	76
2.1.2. Acide aconitique	76
2.2. Transformations en Chimie Verte.....	78
2.2.1. Indicateurs verts	79
2.2.2. Réaction d'estérification	80
2.3. Synthèse et applications d'esters biosourcés.....	80
B) Formulations par microencapsulation	81
1. Microencapsulation.....	81
1.1. Définition	81
2.2. Matière enrobant	82
2.3. Les procédés de microencapsulation.....	83
2.3.1. Atomisation (ou spray-drying).....	84
2.3.2. Efficacité de la matière enrobant et l'atomisation.....	85
Chapitre 2 : Extraction de molécules d'intérêt et évaluation de leurs propriétés biologiques.	88
Article I. Utilisation des extraits de l'algue verte <i>Ulva lactuca</i> comme source de substances actives dans la lutte des moisissures vertes des agrumes après récolte.....	88
Article II. Identification du mécanisme de défense contre <i>Penicillium digitatum</i> à l'origine de la moisissure verte sur les agrumes.....	110
Chapitre 3 : Formulation des extraits aqueux d'<i>Ulva lactuca</i>.	137
Article III. Activité antifongique des extraits aqueux d' <i>Ulva lactuca</i> microencapsulés	137
Article IV. Extraits d'algues vertes formulés avec des ingrédients biosourcés pour la conservation des agrumes après récolte.....	162
Conclusion générale et perspectives	194
Références bibliographiques	198
Annexe.....	214

Liste des figures

Figure 1: Composition des exportations du Liban (2016) - Source : Haut Conseil des douanes.....	18
Figure 2: Répartition de la superficie des agrumes au Liban (Moussa El haji, 2010).	23
Figure 3 : Variation de la quantité d'agrumes produite en tonnes au Liban au cours des années.	23
Figure 4: Evolution des quantités de phyotsanitaires vendus en France entre 2001 et 2015.....	27
Figure 5: Evolution des importations des pesticides au Liban (en milliers de dollars) entre 1985 et 2008 (FAOSTAT).....	28
Figure 6: Examen macroscopique d'oranges infectées par <i>P. digitatum</i> (a), Examen microscopique (x40) <i>P. digitatum</i> en mycelium (b).	31
Figure 7: Mode d'action des fongicides utilisés : (a) en préinfection, (b) en postinfection.	34
Figure 8: Carte des sites de collecte des algues le long de la côte libanaise (Kanaan et al, 2015).	45
Figure 9: Teneur en pigments des algues étudiées par Ismail et al.2017.....	49
Figure 10: Schéma général du prétraitement de la biomasse algale et de la production d'extraits d'algues.	55
Figure 11: Représentation schématique d'une émulsion a : Huile-dans-Eau, b : Eau-dansHuile, c : Eau-dans-Huile-dans-Eau, d : Huile-dans-Eau-dans-Huile.....	66
Figure 12: Représentation schématique des différents mécanismes de déstabilisation pour une huile dans l'eau émulsion.	67
Figure 13: Mûrissement d'Ostwald.....	69
Figure 14: Représentation des différents procédés d'émulsification (Schubert et Engel, 2004).	72
Figure 15: Représentation schématique de la distribution verticale des gouttelettes dans une émulsion huile dans eau instable à la formation de crème : (I) système initial (couche unique) ; (II) temps intermédiaires (trois couches) ; (III) système final (deux couches) (McClements, 2005).....	73
Figure 16: Représentation schématique du crémage dans une huile dans l'eau polydispersée.....	74
Figure 17: Acide citrique.	76
Figure 18: Forme cis et trans de l'acide aconitique.....	77
Figure 19: Les douze principes de la chimie verte.....	79
Figure 20: Présentation schématique du procédé d'atomisation (Murugesan and Orsat, 2012).....	85
Figure 21: Extraits réalisés par macération dans l'eau, l'éthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle.	89
Figure 22: Rendements d'extraction de l' <i>Ulva lactuca</i> séchée (P= 240°C, 80 mg/min).....	89
Figure 23: Teneurs en polyphénols totaux des fractions aqueuses et éthanoliques d' <i>Ulva lactuca</i>	91
Figure 24: Schéma de l'estérification de l'acide aconitique.	163

Liste des Tableaux

Tableau 1: Pesticides associés au cancer (Sadowska et al. 1994).	26
Tableau 2: Composés antifongiques et leurs sites d'action (Ben E De Pauw, 2000).....	32
Tableau 3: Exemples d'extraits des plantes avec une activité antifongique (Ncama et al., 2019).....	38
Tableau 4: Composés majeurs des extraits d'algues (Mayer et al., 2009).....	43
Tableau 5: Classification de l'algue verte <i>Ulva lactuca</i> (Guiry et al. 2008).....	45
Tableau 6: Composition biochimique d' <i>Ulva lactuca</i> collectée de la baie d'Abu-Qir en Egypte (Ismail et al.2017).	46
Tableau 7: Teneurs en éléments minéraux et en glucides chez l' <i>Ulva lactuca</i> issue des côtes égyptiennes (El Said et al, 2013).	47
Tableau 8: Concentration en macroéléments et microéléments de l'extrait liquide aqueux d' <i>Ulva lactuca</i> au Liban (Chbani et al. 2015).....	48
Tableau 9: Composition en monosaccharides de la macroalgue <i>U. lactuca</i> (Yaich et al.2011).....	50
Tableau 10: Profil des acides aminés dans <i>Ulva lactuca</i> (Maehre et al.2014).	51
Tableau 11: Teneur totale en lipides de différentes espèces d'algues <i>Ulva</i> (kendel et al.2015).	52
Tableau 12: Profil en acides gras d' <i>Ulva latuca</i> (Yaich et al.2011).	53
Tableau 13: Extraction par solvant à partir de la biomasse algale.....	55
Tableau 14: Procédés de microencapsulation (Ré, 2006).....	83
Tableau 15: Composition en acides gras de l'extrait d' <i>Ulva lactuca</i> réalisé à l'acétate d'éthyle (en % relatifs).	90
Tableau 16: Economy d'atome (AE) calculées pour la synthèse des esters d'aconitate.	164
Tableau 17: E-factors calculés pour la synthèse des aconitates d'esters.	165
Tableau 18: Calcul de l'efficacité massique de la synthèse des aconitates d'esters.	165

Liste des abréviations

A	Absorbance
AGS	Acides gras saturés
ANSES	Agence française de Santé et sécurité alimentaire environnementale et professionnelle
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ARLA	Agence de réglementation de lutte antiparasitaire du Quebec
ATPase	Adénosine triphosphatase
ATP	Adénosine triphosphate cellulaire
BPIA	Biopesticides Industry Alliance
CAZYmes	Active-carbohydrate enzymes
CCM	Chromatographie sur couche mince
Chl	Chlorophylle
Ch Ul. PFe	Chinese <i>Ulva lactuca</i> Feed powder
Ch Ul. PFo	Chinese <i>Ulva lactuca</i> Food powder
CE	Capacité émulsifiante
CFU	Colony-forming units
CMC	Concentration micellaire critique
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DGAL	Direction Générale de l'alimentation
DPPH	1-diphényl-2-picrylhydrazyle
DW	Dry Weight
EMR	Efficacité Massique de Réaction
EPA	Environmental Protection Agency
FAO	Food and agriculture organization of the united stations
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy

GSH	Glutathion
HPLC	High-performance liquid chromatography
IA	Index adhesion
IMZ	Imazalil
IDAL	Autorité libanaise pour le développement des investissements
Leb Ul.	Lebanese <i>Ulva lactuca</i>
LSD	Least significant difference
MEA	Malt Extract Agar
MS	Matière sèche
ND	Non determine
PAL	Phénylalanine ammoniac-lyase
PBT	Persistant, bioaccumulatif et toxique
PBS	Phosphate-Buffered saline
PDB	Potato dextrose broth
PIB	Produit intérieur brut
PLs	Lyases de pectine
POPs	Polluants organiques persistants
PR	Protéines liées à la pathogenèse
Rf	Rapport frontal
ROIs	Intermédiaires d'oxygène réactifs
SAE	Seaweed aqueous extracts
SFE	Extraction par fluide supercritique
SLEs	Seaweed liquid extracts
SOE	Organic extracts (acetone, ethanol and ethyl acetate)
SOPP	Sodium orthophenyl phonate
TBZ	Thiabendazole
TBARS	Acide thiobarbiturique

TLC

Thin Layer Chromatography

UL

Ulva lactuca

USAID

Agence des États-Unis pour le développement international.

Introduction générale

Au Liban, le secteur de l'agriculture génère environ 4% du produit intérieur brut (PIB) selon l'autorité libanaise pour le développement des investissements (IDAL) [1]. Il emploie environ 6% de la main-d'œuvre libanaise et constitue le 5ème employeur du pays. Les exportations de produits agricoles ont augmenté ces dernières années pour atteindre 465 tonnes en 2016, principalement en raison de la demande croissante de produits frais des pays du Golfe. La composition des exportations du Liban (2016) a montré que 22% des produits agricoles exportés étaient des agrumes, ce qui représente le pourcentage le plus élevé (Figure 1).

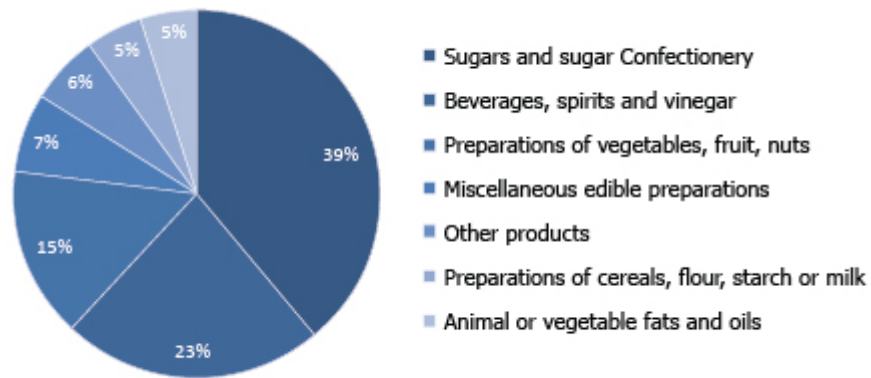


Figure 1: Composition des exportations du Liban (2016) - Source : Haut Conseil des douanes

La culture des agrumes est une activité commerciale et industrielle agronomique importante. Les agrumes sont largement consommés, à la fois en fruits frais et en jus, non seulement pour son goût, mais aussi en raison de sa teneur en vitamine C et de son activité antioxydante.

Cependant, ces agrumes au Liban souffrent de deux problèmes majeurs depuis la récolte jusqu'à leur mise en vente. Le premier se traduit par une diminution de l'humidité pendant la période de stockage, ce qui entraîne une perte de poids aboutissant à une diminution des revenus et bénéfices. Le deuxième problème, réside dans le fait que les agrumes sont caractérisés par une sensibilité

élevée aux infections microbiennes (les moisissures verte et bleue) causées par les champignons ; *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* respectivement.

Ces champignons sont responsables de la majorité des pertes post-récoltes des agrumes cultivés dans des conditions de climat méditerranéen [2-3]. Les besoins des clients sont clairs. Les scientifiques et les chercheurs ont développé de nombreuses solutions depuis le siècle dernier et travaillent toujours sur des solutions différentes les unes des autres.

La solution couramment utilisée actuellement dans le monde, et au Liban en particulier, consiste à utiliser des fongicides chimiques. Les produits frais sont normalement traités avec des fongicides immédiatement après la récolte afin de prévenir les infections, la contamination et l'inhibition de la germination des spores de champignons [4]. L'application de fongicides chimiques sur les agrumes a soulevé des problèmes de santé [5]. La toxicité résiduelle, la cancérogénicité et la pollution de l'environnement, ainsi que le développement de nouvelles souches fongiques résistantes, atténuent le succès des fongicides chimiques [6]. Les chercheurs s'efforcent ainsi de trouver l'équilibre dans lequel la qualité des aliments est préservée sans sacrifier la sécurité des consommateurs [7].

Au cours de la dernière décennie, on note un regain d'intérêt pour les composés actifs d'origine naturelle en tant qu'alternatives aux substances synthétiques. Bien que ces composés présentent souvent une activité plus faible, ils ne laissent pas de résidus toxiques sur les végétaux et leur environnement, ce qui répond aux dernières directives européennes (paragraphe 6 de l'article 3 de la directive 2009/128/CE du 21 octobre 2009) [8].

L'utilisation des composés naturels est l'une des stratégies visant la réduction des fongicides chimiques au cours de manutention post-récolte et de stockage des fruits et légumes [9].

Les extraits d'algues marines vertes riches en substances bioactives ont été déjà mentionnées comme une alternative naturelle à des produits toxiques [10]. Parmi les composés fonctionnels identifiés à partir d'algues marines, les pigments naturels ont reçu une attention particulière. Ces pigments présentent différentes activités biologiques bénéfiques comme anti-oxydants, anti-cancéreux, anti-inflammatoires, anti-obésité, anti-angiogéniques ainsi que des activités neuroprotectrices [11].

Compte tenu de la richesse des côtes libanaises en algues, l'exploitation de cette matière première végétale apparaît comme une opportunité pour l'élaboration de formulations pour lutter contre le *Penicillium digitatum*. Les composés naturels présents dans les extraits d'algues sont susceptibles de répondre aux cahiers des charge d'un biopesticide destiné au traitement des agrumes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont l'objectif principal est d'évaluer l'activité antifongique *in vitro* et *in vitro* des extraits obtenus, contenant des pigments (chlorophylles, carotènes et xanthophylles) et des polysaccharides sulfatés (ulvane) issus de l'algue verte *Ulva lactuca*. Leur mécanisme d'action sur *P. digitatum* est également élucidé. Le second objectif vise à proposer des formulations capables de stabiliser les extraits d'algues et de faciliter leur application et leur action.

Ces objectifs justifient la co-tutelle de ce travail entre le Laboratoire de Biotechnologie Appliquée : Biomolécules, Biothérapies et Bioprocédés (centre AZM) à l'université Libanaise et le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de l'ENSIACET (Toulouse INP). L'expertise d'un troisième laboratoire, le Laboratoire de Chimie des substances naturelles et des Sciences des aliments (LCSNSA) de La Réunion a été sollicitée concernant les propriétés des agents émulsifiants synthétisés.

Le manuscrit de thèse présenté dans ce document s'organise en trois chapitres répartis comme suit :

Le **chapitre 1** propose une mise au point bibliographique, tout d'abord, sur la répartition et la production des agrumes au Liban, puis sur l'utilisation des biopesticides pour lutter contre les maladies post-récolte des agrumes causées par le pathogène *P. digitatum*. Sont également présentées les méthodes d'extraction usuelles, les compositions biochimiques des algues vertes ainsi que les activités biologiques jusqu'alors détectées pour les extraits d'algues vertes. Les méthodes pour préparer des émulsions végétales sont également abordées, ainsi que les voies de synthèse conduisant à un agent émulsifiant. En dernier lieu, les procédés de la microencapsulation sont évoqués dans le but de stabiliser les molécules actives.

Le **chapitre 2** est consacré à la préparation d'extraits de l'algue verte *Ulva lactuca* provenant du Liban et de la Chine pour lutter contre *P. digitatum*. Le chapitre se compose de cinq parties distinctes : (i) L'extraction par des solvants verts (ii) l'identification des chlorophylles et des

ulvanes par analyses chromatographiques, (iii) Les mesures du potentiel antifongique des extraits aqueux (SAE) et des extraits organiques (acétone, éthanol et acétate d'éthyle) (SOE) (iv) la réalisation de tests *in vivo* à l'échelle laboratoire et industrielle (v) l'étude de l'activation des mécanismes de défense des agrumes vis-à-vis de *P. digitatum*

Quatre approches *in vitro* ont été mises en œuvre. L'inhibition de la germination des spores de *Penicillium digitatum* sur le milieu de dextrose de pomme de terre (PDB), la viabilité des champignons sur la gélose à l'extrait de malt (MEA), l'adhésion des spores sur les cellules épidermiques des oranges et finalement, la méthode de diffusion sur disque gélosé.

Les résultats dans ce chapitre sont présentés sous forme de deux articles s'intitulant ; « Control of postharvest citrus green mold using *Ulva lactuca* extracts as a source of active substances » et « *Ulva lactuca* induces defense responses against *Penicillium digitatum*; postharvest green mold on citrus fruit ».

Le **chapitre 3** est consacré à la formulation des extraits aqueux obtenus. Tout d'abord, la microencapsulation des extraits réalisée par atomisation a été évaluée pour conserver l'activité antifongique des molécules actives. Un autre type de formulation a été envisagé, la réalisation d'une émulsion à l'aide d'un agent émulsifiant biosourcé. Ce dernier a été synthétisé à partir d'une molécule plateforme, l'acide aconitique, selon un procédé évalué par des indicateurs verts. Les résultats dans ce chapitre font l'objet de deux articles s'intitulant : « Green seaweed extract formulated with biobased ingredients for postharvest citrus fruit preservation » et « Anti-fungal activity of microencapsulated aqueous extracts from *Ulva lactuca* ».

A la fin du manuscrit, une conclusion générale amenant à quelques perspectives est présentée.

Chapitre 1 : Analyse bibliographique

I. Partie 1 :

A. Traitement post-récolte des agrumes au Liban

1. La production d'agrumes au Liban

Au Liban, les plantations d'agrumes représentent une superficie totale de 99,939 ha au titre de la campagne agricole de 2010 et sont essentiellement localisées au niveau de la plaine côtière de la Mohafaza du Sud et le littoral du Mont-Liban jusqu'à Jbeil. Selon les chiffres issus du ministère de l'agriculture Libanais, la culture des agrumes se trouve majoritairement dans le Sud avec près des deux tiers de la superficie cultivée (64%) suivie par la région Akkar (14%) et par le Liban Nord (12%) (Figure 2).

Les principales variétés cultivées sont les oranges, les mandarines, les citrons et les pamplemousses. Les agrumes sont un terme commun et un genre de plante à fleurs de la famille des rutacées. Les agrumes sont l'une des cultures vivrières les plus populaires au monde. De nombreuses espèces sont cultivées pour leurs fruits qui sont consommés frais ou transformés en jus. Le jus contient une grande quantité d'acide citrique, ce qui lui donne cette saveur particulière; il est également une bonne source de vitamine C et de flavonoïdes [12].

Les principales variétés d'agrumes cultivées au Liban sont les suivantes : la variété Valencia représente 3 000 ha, tandis qu'environ 2000 ha de Navel Washington et 1200 ha de Sweet Blood Java sont comptabilisés [13].

La production des agrumes au Liban s'élevait à 230 497 tonnes en 2013 (source l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, FAO) (FAOSTAT, 2016) [14]. La production d'agrumes a atteint un maximum (464,318 tonnes) en 1991 puis entre 2004 et 2007, avant d'entamer une diminution régulière pour se stabiliser à 306,924 tonnes en 2017.

Les principaux importateurs d'oranges libanaises sont les pays arabes dont l'importateur majoritaire est l'Arabie Saoudite qui représente près de 45% des exportations libanaises [15].

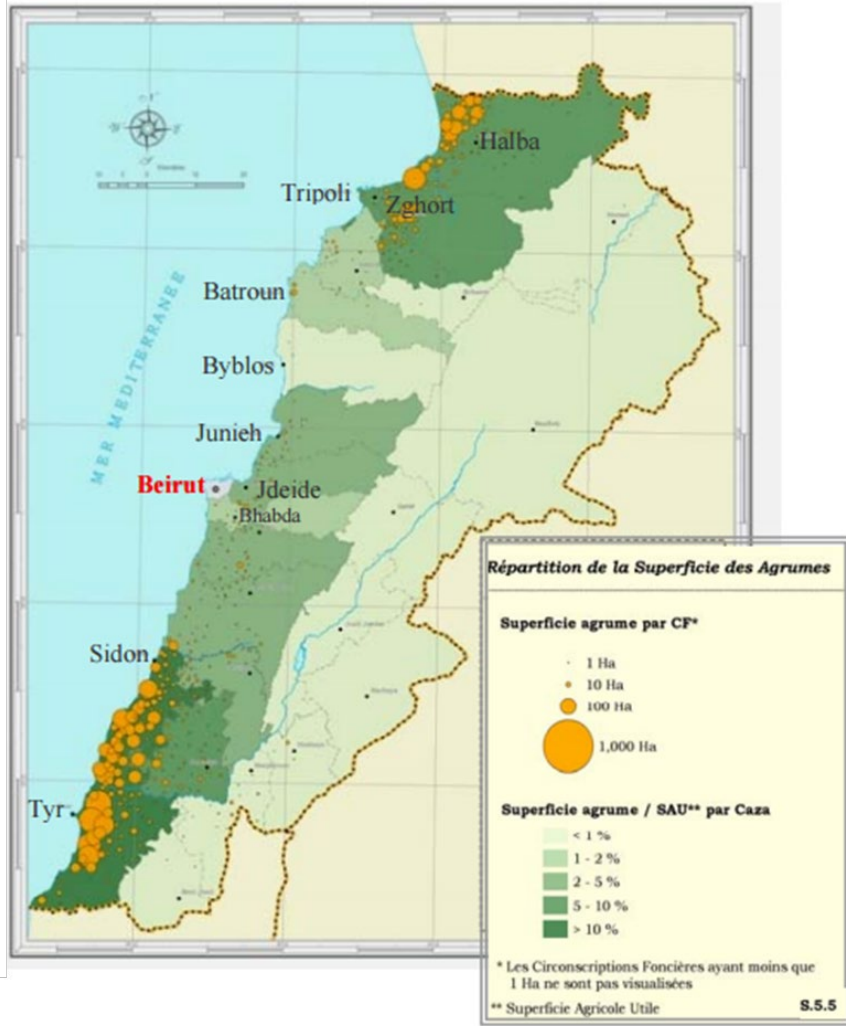


Figure 2: Répartition de la superficie des agrumes au Liban (Moussa El hajj, 2010).

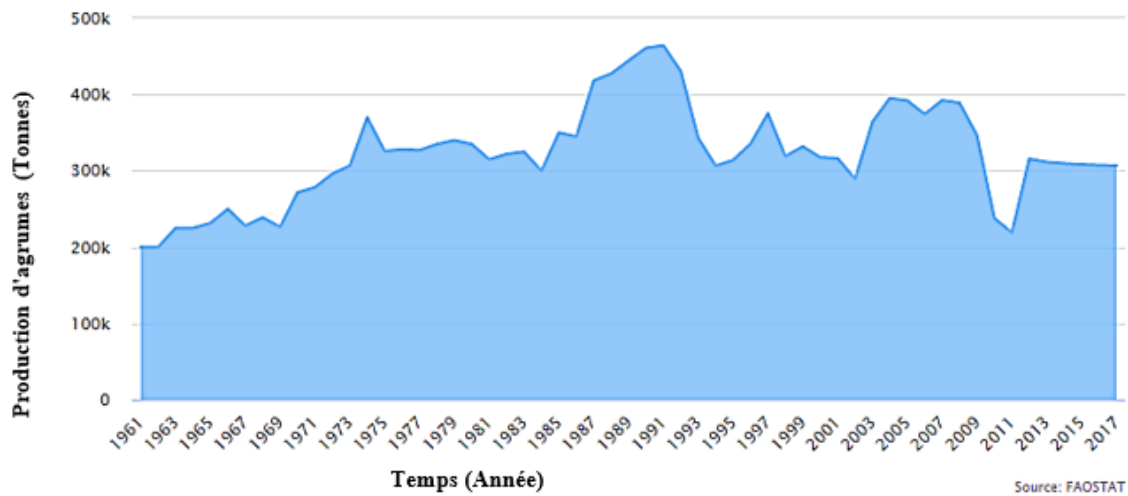


Figure 3 : Variation de la quantité d'agrumes produite en tonnes au Liban au cours des années.

Les agrumes sont traditionnellement l'un des produits agricoles qui s'exporte le plus à l'étranger. Mais le secteur est en déclin au Liban : la production totale a baissé de 45 % entre 2007 et 2013, d'après un rapport de l'Agence des États-Unis pour le développement international (Usaid), publié en 2013. Comme tous les autres fruits et légumes libanais, qui sont exportés en grande partie vers le Golfe, les exportations d'agrumes sont en chute libre depuis la fermeture de la frontière syro-jordanienne en avril 2015. En 2016, les exportations avaient diminué de moitié par rapport à 2012 [16].

La faible rentabilité des agrumes est liée à des problèmes structurels qui minent le secteur depuis longtemps, dus à des coûts élevés de production. Le rapport Usaid indique que si les agriculteurs étaient organisés en coopératives, cela permettrait d'amortir certains coûts de production. De plus, les agriculteurs libanais suivent des pratiques traditionnelles, pas toujours conformes aux normes internationales.

Il faut être vigilant sur l'utilisation excessive et non contrôlée de pesticides cancérigènes qui peuvent pénaliser la filière. Dans le quotidien L'Orient-Le Jour daté du 10 novembre 2009, Le ministre de l'Environnement, Antoine Karam, a dénoncé l'usage « arbitraire » des pesticides par les agriculteurs. En effet, les taux de pesticides contenus dans presque la moitié de la production nationale de fruits et légumes sont anormalement élevés. Cette pratique peut être à l'origine de la prolifération et la résistance de certains agents pathogènes fongiques post-récolte aux quelques fongicides utilisés [17].

2. Les Pesticides

2.1. Définition

L'agence de protection environnemental (EPA) des États-Unis définit un pesticide comme étant « toute substance ou mélange de substances destiné à prévenir, détruire, repousser ou atténuer tout organisme nuisible » [18].

Les pesticides sont largement utilisés pour protéger les cultures contre les organismes nuisibles tels que les mauvaises herbes, les plantes pathogènes ou les parasites. Toutefois, l'utilisation de pesticides peut également être associée à des risques pour l'environnement

(pollution des sols et des nappes phréatiques) et la santé humaine principalement par l'exposition des agriculteurs ou par la contamination des denrées alimentaires [5].

2.2. Classification

Les pesticides les plus courants sont classés selon leur rôle fonctionnel et selon la famille chimique. Dans le premier cas, les pesticides sont répertoriés selon le type d'organisme à éliminer et sont alors répartis comme suit [19] :

Les herbicides, le rôle est de détruire ou d'empêcher la croissance des végétaux indésirables et des herbes qui peuvent entrer en concurrence avec les cultures agricoles. Les molécules actives des herbicides englobent diverses catégories de fonctions chimiques: acides carboxyliques, aliphatiques, amides, chloroacétanilides, benzonitriles, dinitrophénylaminés, phénols et autres [20].

Les insecticides : substances qui ont pour rôle d'éliminer les insectes considérés comme nuisibles ou indésirables pour les plantes et cela en exerçant sur ces dernières des actions neurotoxiques, régulatrices de croissance et inhibitrices de la respiration. Leurs principes actifs sont généralement des composés organochlorés qui ont été progressivement remplacés par des organophosphorés et des carbamates considérés moins toxiques [19].

Les fongicides : substances qui ont pour rôle de lutter contre les parasites comme les champignons ou les moisissures.

La 2ème classification consiste à répartir les pesticides selon la nature chimique de la substance active majoritaire :

Les organochlorés : issus de l'industrie du chlore tels que le dichlorodiphényltrichloroéthane, le lindane, le chlordane... Les organophosphorés : amides ou esters des acides phosphoriques, phosphonique, thiophos-phorique et thiophosphonique (diazinon, dichlorovos, malathion...). Les carbamates formés par des sels ou esters d'acide carbamique (carbaryl, propoxure...). Les triazines (atrazine, propazine, simazine ...). Les urées substituées incluant plusieurs groupes fonctionnels : phénylurées [21-24].

2.3- Emploi intensif des pesticides à usage agricole

2.3.1- Effets sur la santé humaine

La révolution verte nous a enseigné que l'emploi intensif de pesticides et d'engrais est nocif pour les écosystèmes et par conséquent pour la santé de l'animal et de l'homme. Plus de 150 études réalisées dans 61 pays et régions du monde ont abouti à la constatation de présence des résidus de pesticides dans les tissus adipeux, le cerveau, le sang, le lait maternel, le foie, le placenta, le sperme et le sang du cordon ombilical [25]. L'épidémiologie a ainsi montré que les personnes exposées aux pesticides encourent plus de risques de développer de nombreuses pathologies telles que la leucémie, l'asthme, l'allergie ainsi que les perturbations endocriniennes et les cancers [26] (Tableau 1). De plus, maintes preuves suggèrent une relation entre les pesticides et les anomalies congénitales, la diminution du poids à la naissance et la mort fœtale [27].

Tableau 1: Pesticides associés au cancer (Sadowska et al. 1994).

Type Cancer	Pesticide(s)	Famille chimique
Tous cancers	Diazinon	Organophosphate
Poumon	Chlorpyrifos	Organophosphate
Pancréas	EPTC	Thiocarbamate
Colon	Dicamba	Benzoic acid
Rectum	Chlordane	Organochlorine
Leucémie	Fonofos	Organophosphate
Mélanome	Carbaryl	Carbamate

2.3.2- Effet des pesticides sur l'environnement

Il a été estimé que moins de 0.1% des pesticides atteigne les organismes nuisibles cibles, le reste passe dans l'environnement et contamine le sol, l'air et l'eau en affectant des organismes non visés [28]. Il est indéniable que la contamination du sol est causée par les pesticides contenant des polluants organiques persistants (POPs) qui peuvent rester dans la nature plusieurs années altérant ainsi la biodiversité et la qualité du sol [29], [30].

Le lessivage des particules polluantes dans le sol et la propagation des pesticides volatiles par l'eau de pluie, assurent la contamination des eaux souterraines et superficielles. On assiste par conséquent à une eau impropre à la consommation et à une perturbation de l'écosystème marin [31].

2.4- Usage des pesticides en France

Sur le plan mondial, les systèmes actuels de gestion agricole et de production végétale reposent sur l'utilisation d'herbicides, de fongicides et d'insecticides à une quantité d'environ $3,3 \times 10^6$ tonnes/an, dont $0,42 \times 10^6$ tonnes/an pour l'Europe [32].

Avec un chiffre d'affaires de 1,9 milliards d'euros, la France était considérée comme le premier marché européen des phytosanitaires en 2010. Cette valeur a augmenté de 5% en 2012 pour atteindre près de 2 milliards d'euros [33]. Les quantités de pesticides vendues en France entre 2001 et 2015 sont présentées dans la figure 4. On remarque que depuis 2009, les ventes stagnent. Les fongicides représentent la famille des pesticides la plus vendue par rapport aux insecticides et aux herbicides. Les quantités de fongicides vendus ont bien diminué entre 2001 et 2015, passant de 54000 tonnes à 27000 tonnes, mais ceci a été accompagné par une augmentation dans les quantités d'herbicides et insecticides vendus [33].



Figure 4: Evolution des quantités de phytosanitaires vendus en France entre 2001 et 2015.

Bien que les produits actuellement utilisés soient considérés moins nocifs pour l'environnement que les pesticides organochlorés interdits, de nombreux pesticides encore utilisés dans le monde sont assez persistants et toxiques. Ainsi, 150 des matières actives approuvées par l'Union Européenne présentent une toxicité aiguë (niveau 1), neuf affectent négativement la reproduction (niveaux 1A/1B) ou sont des perturbateurs endocriniens, six peuvent avoir des propriétés cancérigènes et environ 50 composés correspondent aux critères PBT (persistant, bioaccumulatif et toxique). Par conséquent, un plan qui visait à réduire de 50 % l'usage des produits phytosanitaires en France à l'horizon 2018 a été mis en place en 2010 sous le nom de plan Ecophyto 2018 [33].

2.5- Usage des pesticides au Liban

Au Liban, les chiffres de la banque de données « FAOSTAT » de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) sur les importations de pesticides fournit une indication sur les pratiques d'utilisation des produits phytosanitaires au Liban et de leur évolution. La figure 5 révèle une augmentation lente et régulière des importations de substances actives phytosanitaires jusqu'à 1997. Finalement ceux-ci ont remonté depuis 2001 pour doubler en 2008 avec un creux en 2006.

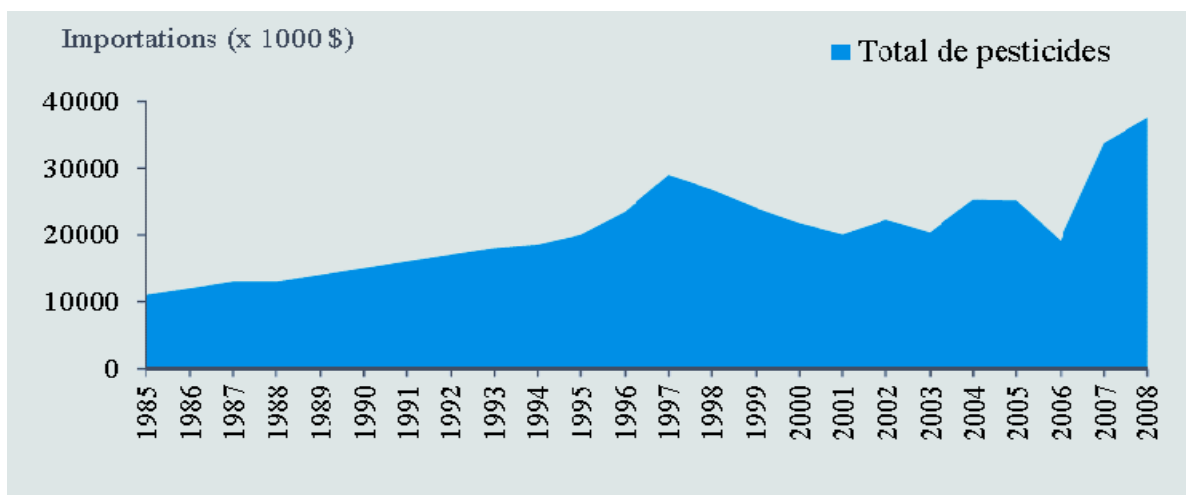


Figure 5: Evolution des importations des pesticides au Liban (en milliers de dollars) entre 1985 et 2008 (FAOSTAT).

En 1992, le ministère de l'Agriculture a établi une liste des pesticides officiellement interdits, cependant, peu de contrôles sont effectués et les interdictions ne sont pas respectées. Même les produits bannis sont disponibles par des moyens illégaux et utilisés par les publics non-formés, en plus de l'utilisation abusive de plusieurs molécules, indépendamment de tout risque de toxicité pour la santé et l'environnement [34-35].

En ce qui concerne les produits phytosanitaires interdits, on peut citer le malathion, un insecticide organophosphoré interdit par la commission européenne (CE) dans la décision 2007/389/CE mais encore utilisé au Liban. De plus, depuis 2012, les résidus de ce pesticide dans les aliments sont réglementés en Europe. Selon l'Agence française de Santé et sécurité alimentaire, environnementale et professionnelle (ANSES), ce pesticide n'est pas toxique par lui-même mais il peut se décomposer en donnant le malaoxon qui est connu pour provoquer la leucémie et inhiber l'acétylcholinestérase. Le zineb est un autre pesticide interdit par l'Union européenne (UE) mais vendu au Liban sous forme de soufre micronisé pour échapper à toute poursuite législative. On note également au Liban, l'utilisation abusive et la pulvérisation en grandes quantités des pesticides sans tenir compte des doses préconisées ce qui conduit à des dépassements par rapport aux limites maximales de résidus (MRLs) fixées pour les aliments (FAOSTAT).

3. Les maladies phytopathogènes

3.1. Définition d'une maladie de plante :

Une maladie chez les végétaux peut être définie par une succession de réponses invisibles et visibles des cellules et des tissus d'une plante, suite à l'attaque d'un micro-organisme ou à la modification d'un facteur environnemental qui provoquent des bouleversements de forme, de fonction ou d'intégrité de la plante. Ces réponses peuvent induire une altération partielle voire la mort de la plante ou de certaines de ses parties. Les maladies des plantes sont parfois regroupées par type de symptômes (pourriture racinaire, flétrissements, taches foliaires, rouilles, broussures, niellure), par types d'organes qu'elles affectent (maladies racinaires, maladies des tiges, maladies foliaires), par type de plantes affectées (herbacées, maraîchères, ...), mais le critère le plus utile reste la classification par le pathogène responsable de la maladie [36].

On peut classer les maladies des plantes comme suit [37]:

-Maladies infectieuses (biotiques) causées par des champignons, des procaryotes, des plantes supérieures parasites, des virus et viroïdes, des nématodes, des protozoaires.

-Maladies non infectieuses (abiotiques) causées par un stress en température, le manque ou l'excès d'humidité ou de lumière, le manque d'oxygène, la pollution atmosphérique, les déficiences nutritionnelles, la toxicité minérale, l'acidité ou l'alcalinité du sol, la toxicité des pesticides et les mauvaises pratiques culturales.

3.2. *Les microorganismes attaquant les agrumes*

Les maladies et parasites des agrumes sont nombreux et beaucoup n'ont pas de traitement efficace. Les infections peuvent survenir au verger et ne se révéler qu'après récolte, ou contaminer les fruits au cours des opérations de triage, d'emballage et d'entrepôt, et parfois même à l'échelon domestique quelques jours seulement avant leur consommation.

Sur les agrumes, plus de 25 espèces différentes de pathogènes peuvent exister mais les plus fréquentes sont les champignons tels que : *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum citri-aurantii* et *Phytophthora*.

Certaines espèces peuvent pénétrer les épidermes intacts, d'autres n'envahissent les tissus qu'à l'occasion de blessures plus ou moins profondes. Les sources de contamination en entrepôt sont nombreuses ; les produits frais peuvent être contaminés par des champignons et des bactéries pendant la saison de croissance, ainsi que tout au long du processus, de la récolte jusqu'à l'entreposage. De plus, la présence de débris végétaux dans les entrepôts permet aux microorganismes de se multiplier en grand nombre et de devenir une importante source de contamination pour les produits entreposés [38]. Les contenants utilisés lors de la récolte et de l'entreposage, les appareils de traitement et de conditionnement ainsi que l'air et les parois des entrepôts sont aussi des sources de contamination [39].

3.2.1. *Penicillium digitatum*

Au niveau mondial, *Penicillium digitatum* est l'un des agents pathogènes les plus dévastateurs, avec le *Penicillium Italicum*, causant à eux d'eux jusqu'à 80% des pertes en agrumes par pourriture [40]. *P. digitatum* est un champignon pathogène qui attaque uniquement au niveau de l'écorce fragilisée ou « blessée » du fruit dans le verger, lors de sa distribution ou de sa commercialisation

(Figure 6). Il se reproduit très rapidement, et ses spores sont omniprésentes dans l'atmosphère, sur les surfaces de fruits et sont facilement disséminées par les courants d'air. Il est facilement détectable par sa couleur caractéristique verte/grise. La source d'inoculum fongique dans les vergers d'agrumes et fruitières est pratiquement continue au cours de la saison [41]. En outre, il est connu que le flavedo, la partie colorée externe de l'écorce est plus résistant à *P. digitatum* que l'albédo, la partie blanche intérieure [42]. Ce fait a été classiquement associé à la présence des composés antifongiques préformés et induits dans le flavedo [43].

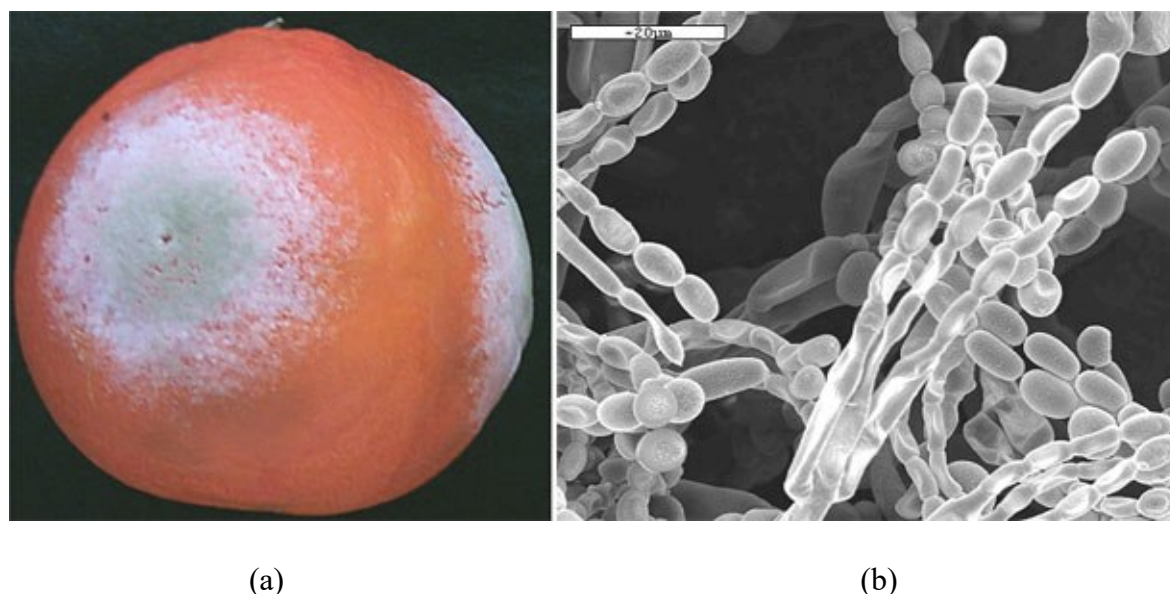


Figure 6: Examen macroscopique d'oranges infectées par *P. digitatum* (moisissures vertes) (a), Examen microscopique (x40) *P. digitatum* en mycelium (b).

3.3. Les approches de lutte contre les agents pathogènes.

3.3.1. Traitement thermique

Le traitement thermique est une technique couramment utilisée dans l'industrie alimentaire. Les champignons sont inactivés par la chaleur, comme dans la pasteurisation ou la stérilisation. Cependant, les ascospores de certains champignons sont résistantes à la chaleur et peuvent survivre à des températures élevées (85 ° C), par exemple celles de *Talaromyces macrosporus* [44] . En outre, la germination et la croissance sont empêchées par une faible pression d'oxygène et un ajout des acides organiques qui sont utilisés pour préserver le fourrage de l'herbe dans les silos avec ce

qu'on appelle le processus d'ensilage. La faible concentration en oxygène et les acides organiques dans les silos réduisent le métabolisme des champignons empêchant leur croissance. Abaisser les activités aquatiques prévient également la croissance fongique. Néanmoins, certains champignons osmotolérants et xérophiles sont capables de croître en présence de fortes concentrations de sucre et de sel et peuvent causer une détérioration dans ces conditions [45].

3.3.2. Traitement chimique

De nos jours, un large éventail d'agents antifongiques est utilisé dans la lutte contre la biodégradation et dans la prévention ou le traitement des maladies fongiques des plantes et pour le traitement des maladies chez les animaux et les humains (Tableau 2) [45].

Tableau 2: Composés antifongiques et leurs sites d'action (Ben E De Pauw, 2000).

Antifungals	Target sites
Benzimidazoles; Griseofulvin	Mitosis
5-Fluorocytosine	Nucleic acid synthesis
Acylalanines	RNA polymerase I
Kasugamycin; Sordarins	Protein synthesis
Carboxamides; Strobilurins	Respiration
Fosetyl-AL	Phosphate metabolism
Imidazoles; Triazoles; Thiocarbamates	Ergosterol synthesis
Nystatin; Amphotericin B; Natamycin;	Plasma membrane
Polyoxin; Nikkomycins; Echinocandins	Cell wall synthesis

Les polyènes antifongiques comprennent trois composés principaux : la natamycine, la nystatine et l'amphotericine B. Ces composés agissent en augmentant la perméabilité de la membrane des cellules fongiques, après la liaison aux stérols (par exemple, l'ergostérol) causant la mort de la cellule [46]. Plusieurs tests de susceptibilité *in vitro* pour des agents antifongiques ont été développés afin d'établir de meilleures approches chimio thérapeutiques contre les infections fongiques. La Nystatine est utilisée dans les pratiques médicales, vétérinaires et agricoles, mais elle est insoluble dans l'eau et toxique, surtout par sa néphrotoxicité dépendante de la dose [47].

Le Sodium ortho-phenylphenate (SOPP), le thiabendazole (TBZ), et l'imazalil (IMZ) sont parmi les fongicides les plus couramment utilisés dans le monde quant à la lutte chimique utilisée en

post-récolte sur les fruits d'agrumes. Chacun possède un mode d'action différent, ils sont utilisés seuls, combinés dans des mélanges, ou appliqués séparément en séquence.

SOPP est un hydrocarbure aromatique, il a la caractéristique de pénétrer au niveau des blessures sur les fruits mais il n'est pas systémique. Il se trouve sous forme de solutions aqueuses à une concentration de 2% ou sous forme d'émulsion dans des cires hydrophiles à une concentration de 1%. Le produit est généralement appliqué sous forme de bain moussieux.

Le Thiabendazole (TBZ) est appliqué sur les fruits d'agrumes par pulvérisation au niveau de la chaîne de conditionnement ou par douchage comme prétraitement et particulièrement avant déverdisage. TBZ est utilisé contre les pourritures à *Penicillium* à une concentration de 2000 ppm en solution aqueuse et à une concentration de 4000 ppm dans la cire. Sur fruits pourris, la sporulation n'est inhibée qu'à des concentrations de 4000 à 6000 ppm. En ce qui concerne l'Imazalil ou l'Enilconazole, C'est un fongicide de la famille des imidazoles, il agit par inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol, il peut être utilisé en prétraitement des fruits qui vont subir le déverdisage, mais il est uniquement employé au niveau de la chaîne de conditionnement. Selon l'agence de protection environnemental, US EPA « *l'Imazalil est identifié comme susceptible d'être cancérigène chez l'homme* », puisqu'il conduit à des troubles du développement et de la reproduction chez les souris. Il faut noter que d'autres inhibiteurs de la biosynthèse d'ergostérol sont utilisés [48].

Il y a globalement 2 types de fongicides : ceux qui ne sont pas absorbés par les tissus de la plante et qui affectent la germination des spores (protectants). Ceux qui sont absorbés par la plante et qui affectent la croissance du champignon (curatifs).

Les fongicides peuvent être utilisés selon deux modes d'intervention, soit en préinfection, soit en postinfection. Un fongicide utilisé en préinfection est appliqué avant le début d'une période d'infection. Le produit sera efficace seulement sur les feuilles et les fruits présents au moment de la pulvérisation en supposant qu'aucun délavage par la pluie n'ait eu lieu. La molécule active agira sur les premiers stades de développement du champignon comme la germination des spores (figure 7.a). Les fongicides utilisés en postinfection sont appliqués après une période d'infection. Ces fongicides agissent sur un stade de développement plus avancé du champignon et empêchent celui-ci de coloniser le tissu végétal (figure 7.b). Cette approche est efficace contre une infection non

prévue ou contre les infections graves (risques élevés). Elle permet de pallier à un délavage du traitement précédent.

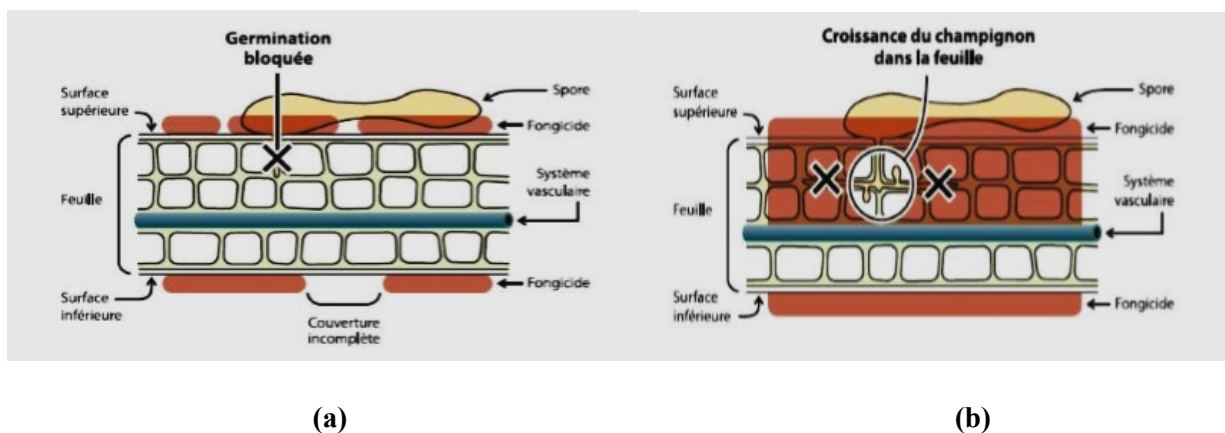


Figure 7: Mode d'action des fongicides utilisés : (a) en préinfection, (b) en postinfection.

Les modes d'action des fongicides peuvent être divisés en deux grandes catégories : les fongicides unisites et les fongicides multisites.

Les fongicides unisites agissent à un stade spécifique du développement du champignon. Ces fongicides sont plus sujets au développement de résistance. Une seule mutation ou changement de la part du champignon lui permet d'éviter l'effet du fongicide. La biosynthèse de composés essentiels au développement du champignon, la respiration et les processus de division cellulaire sont les cibles les plus communes des fongicides unisites.

Comme le nom l'indique, les fongicides multisites agissent à plusieurs niveaux du développement du champignon. Ces fongicides sont ainsi beaucoup moins sujets au développement de la résistance. La plupart des fongicides de contact et les éléments comme le soufre et le cuivre appliqués en préinfection font partie de cette catégorie.

3.3.3. Traitement biologique

Le contrôle biologique des maladies en post-récolte a été utilisé comme une alternative pour les fongicides synthétiques. Son mécanisme est basé sur les interactions écologiques, telles que la concurrence spatiale, la recherche de nutriments ou l'induction de défense de la plante [49-52].

Traditionnellement, les levures sont les organismes les plus fréquemment utilisés comme agents de lutte biologique en raison de leur colonisation rapide de la surface des plantes et leur production

de polysaccharides extracellulaires qui améliorent leur survie pour restreindre la colonisation et la germination des pathogènes [53].

Des études réalisées par Pimenta et al., (2008) [54] ont montré que la levure prédateur *Saccharomycopsis schoenii* présente la capacité de réduire la gravité de la maladie provoquée par *Penicillium italicum*, *P. digitatum* et *P. expansum* en empêchant la formation des lésions sur la surface des oranges pendant 21 jours.

De même une substance antifongique : 2-phenylethanol (PEA), isolé de *Kloeckera apiculata* a démontré des propriétés antifongique contre les moisissures phylopathogènes d'agrumes [55].

3.3.4. Utilisation des biopesticides

3.3.4.1. Généralités

Les augmentations récentes de la population ont entraîné une augmentation de la demande alimentaire et, par conséquent, une plus grande utilisation des produits agrochimiques. Les produits agrochimiques comprennent deux grands groupes de composés : les pesticides et les engrais. Rappelons que les pesticides sont des substances utilisées pour prévenir, détruire ou contrôler les ravageurs dans les cultures végétales [56]. Malgré leurs effets inhibiteurs sur les ravageurs nuisibles aux végétaux et aux animaux, les pesticides peuvent également être toxiques pour l'homme et polluer l'environnement [57]. Les inquiétudes concernant la perte de cultures végétales dues à la présence de parasites, la demande accrue d'aliments sûrs et les conséquences environnementales causées par l'utilisation de pesticides synthétiques démontrent l'importance de développer des recherches dans le domaine des biopesticides. Il s'agit d'alternatives plus sûres comparés aux pesticides synthétiques, en particulier grâce à leur biodégradabilité et leur origine naturelle, car dérivées d'organismes vivants ou de leurs métabolites [58].

Les pesticides d'origine biologique peuvent agir efficacement dans la lutte antiparasitaire à travers divers mécanismes, par exemple en inhibant la croissance, la nutrition, le développement ou la reproduction d'un parasite ou d'un pathogène. Pour cela, les biopesticides libèrent des endotoxines et des enzymes capables de dégrader la paroi cellulaire des organismes invasifs ou même de provoquer des infections virales chez les parasites [59].

L'utilisation des biopesticides est en croissance et la production de biopesticides augmente actuellement de 16% par an, soit près de trois fois celle des produits agrochimiques classiques, qui croît à un taux de 5,5% par an. Ainsi de nouvelles substances actives ont été introduites avec succès, en tant que biopesticides, dans le processus de protection. Ces composants spécifiquement actifs comprennent les protéines, les polysaccharides et les petites molécules (alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, huiles essentielles) provenant de plantes, de protéines et de polysaccharides de microorganismes, de polysaccharides d'algues et d'oligochitosane d'animaux [59].

3.3.4.2. Classification des biopesticides

Les biopesticides sont classés selon *l'Agence de réglementation de lutte antiparasitaire du Québec (ARLA)*, *Biopesticides Industry Alliance (BPIA)* et *Environmental Protection Agency des États-Unis (EPA)*, en plusieurs catégories, à savoir :

Les biopesticides microbiens sont formés par des bactéries, des champignons, des oomycètes, des virus et des protozoaires. De nombreuses substances actives sont dérivées de ces différents microorganismes, ce sont principalement ces substances qui procèdent contre le bio agresseur plutôt que le microorganisme lui-même [60]. Ces biopesticides ont habituellement des effets létaux ou inhibiteurs résultant d'une interruption physique ou biochimique de la croissance et du développement de l'organisme nuisible (parasitisme, antagonisme ou allélopathie) [61]. En fait, pour tous types de cultures confondus, le marché des biopesticides se décline en : 74% de biopesticides bactériens, 10% de biopesticides fongiques, 5% de biopesticides viraux, 8% de biopesticides prédateurs, et 3% de biopesticides autres [59].

Les bactéries

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont les pesticides les plus largement utilisés dans ce domaine, en particulier *Bacillus thuringiensis* largement utilisé comme biopesticide microbien [62]. Cette bactérie ne nuit pas aux vertébrés et est sans danger pour l'homme et son environnement. Les pulvérisations de *B. thuringiensis* sont efficaces pour la lutte contre les ravageurs des cultures de fruits et légumes, lorsque la sélectivité et la sécurité sont recherchées ou lorsque la résistance aux insecticides chimiques synthétiques pose des problèmes [63].

Des bactéries autres que le genre *Bacillus* ont été aussi utilisées comme biopesticides. Comme exemple la souche *Pseudomonas chlororaphis* est utilisée dans la prophylaxie et le traitement de certains champignons. Cette bactérie est capable d'agir contre les phytopathogènes par antibiose directe, par compétition spatiale et nutritive ou par activation des défenses des plantes [60].

Les champignons

Environ 750 espèces, appartenant à 100 genres de champignons entomopathogènes ont été signalés, mais seulement une dizaine d'entre elles ont été ou sont actuellement développées pour la lutte contre les insectes [64].

Les champignons entomopathogènes peuvent être classés en deux groupes principaux : les champignons biotrophes et les champignons nécrotrophes. Le premier groupe renferme des champignons nécessitant des cellules vivantes de leurs hôtes. Cette catégorie de champignons est très répandue dans de nombreuses régions, mais ils ne sont pas largement utilisés pour lutter contre les parasites, car ils sont soit asymptomatiques chez les insectes, soit les changements causés par les pathogènes sont difficiles à observer. Cependant, les champignons appartenant au deuxième groupe vivent au détriment des cellules mortes ; ils doivent tuer leurs hôtes avant de les consommer. Les champignons appartenant à ce groupe sont très efficaces dans leur attaque, pour cette raison beaucoup d'entre eux sont des agents potentiels de contrôle biologique des insectes.

Beauveria bassiana, *Nomuraea rileyi* et *Metarhizium anisopliae* peuvent infecter environ 100 espèces d'insectes d'une grande variété. Ces champignons sont formulés comme des produits commerciaux et sont de bonnes alternatives aux pesticides organophosphorés et organochlorés ayant des actions persistantes et nocives [64-65].

Les virus

Parmi les différentes familles de virus infectant les insectes, seuls ceux appartenant à la famille hautement spécialisée *Baculoviridae* ont été considérés comme des pesticides potentiels. Ils sont très sécuritaires pour les êtres humains et pour la faune. Leur spécificité est très étroite, souvent limitée à une seule espèce. L'usage de ces composés comme biopesticides a été limité du fait de leur lente action de destruction et ils ont été considérés comme inefficaces. Cependant, cette attitude change avec le temps et la protection contre les baculovirus devient une méthode de choix pour une protection à long terme des cultures [66].

Les biopesticides d'origine végétale / biochimiques :

Les plantes, source importante de biopesticides, produisent une grande variété de métabolites secondaires qui manquent de fonction apparente dans les processus physiologiques ou biochimiques. Ces composés jouent un rôle important dans la médiation des interactions entre les plantes et leur environnement biotique. Ces substances ont des caractéristiques aseptiques, insecticides, et même régulatrices de la croissance des plantes et des insectes qui défendent les plantes des herbivores [67-68].

En effet, plusieurs plantes ont été testées *in-vitro* et *in-vivo* pour leurs activités antifongiques. Citons à titre d'exemple : l'extrait aqueux des feuilles de *Solanum nigrum* ainsi que l'extrait alcoolique de plusieurs parties de *Capsicum frutescence* (Chilly) et du rhizome de *Zingiber officinale* (Ginger), qui ont montré une activité inhibitrice importante vis-à-vis de la croissance *in-vitro* du champignon *Penicillium digitatum* [69-70]. De plus, Andreu et al., (2018) [71] ont trouvé que les extraits éthanoliques de *Salix alba* et *Artemisia absinthium* se sont avérés les plus efficaces contre *Plasmopara viticola*, avec une inhibition totale de la germination des spores lorsqu'ils sont appliqués à 1000 mg/L.

Une variété des extraits de différentes parties de plantes se sont avérés fongicides vis-à-vis de certaines souches (Tableau 3) [72].

Tableau 3: Exemples d'extraits des plantes avec une activité antifongique (Ncama et al., 2019).

Targeted fungus	Plant	Extracted part	Extracting solution	Assessment technique/medium	Activity measure/inhibition
<i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , and <i>Penicillium</i> sp.	<i>Dumortiera hirsuta</i> (Swaeagr.) Nees	Entire plant	Water	In-vitro in petri dish: PDA medium	Spore germination and percent radial growth
<i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Rhizopus</i> and <i>Aspergillus niger</i> sp.	<i>Mentha spicata</i> L., <i>Ocimum basilicum</i> L. and <i>Anethum graveolens</i>	Leaves	Ethanol	In-vitro in petri-dish: PDA medium	Radial growth
<i>Alternaria alternata</i> and <i>A. niger</i>	<i>Arisaema tortuosum</i>	Aerial parts	Methanol	Tube dilution: SDA medium	Linear growth
<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Clerodendrum infortunatum</i> L., <i>Polyathia longifolia</i> Sonn., and <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Leaves	N-Alkaline sulfonate and K-Alkaline sulfonate with light solvent naphtha	In-vitro in petri dishes: PDA medium	Radial growth
<i>A. parasiticus</i>	<i>Cistus incanus</i>	Aerial parts	Methanol:water (80:20)	In vitro and in-vivo: Yeast-extract-sucrose medium, and macademia nuts	Inhibition of aflatoxin B ₁
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Monilinia fructigena</i> and <i>Alternaria solani</i>	<i>Prunus laurocerasus</i> L., <i>Cornus mas</i> L., <i>Morus nigra</i> L., <i>Morus alba</i> L. and <i>Rosa canina</i> L.	Leaves, fruit and/or leaves	Methanol and n-hexane extracts	In-vitro and in-vivo	Mycelial growth inhibition

PDA, potato dextrose agar; SDA, sabouraud dextrose agar.

De plus, plusieurs preuves suggèrent l'activité antifongique intéressante des huiles essentielles capables d'inhiber la germination des spores et la croissance mycélienne [73]. Les terpènes et les huiles essentielles riches en terpène sont largement utilisés et contiennent une diversité de molécules antifongiques. Ils sont homologues à l'eugénol, le géraniol, le thymol [74]. Popovici et al., (2008) ont étudié l'activité antifongique de l'huile essentielle et les composés volatils des fruits *Myrica gale* contre *Aspergillus flavus*, *Cladosporium cladosporioides* et *Penicillium expansum* [75].

Ces composés interviennent dans les mécanismes de défense naturels de nombreuses espèces végétales, montrant généralement une sélectivité élevée vis-à-vis des organismes nuisibles cibles avec une faible toxicité pour les mammifères, les oiseaux et les poissons, en plus d'être biodégradables [76].

Les biopesticides d'origine animale / semio-chimiques : Ces molécules sont impliquées dans la communication chimique à l'intérieur et entre les espèces. Ce sont des signaux chimiques produits par un organisme qui cause un changement de comportement chez un individu de la même ou d'une espèce différente. Les produits semio-chimiques ne soient pas des biocides par eux-mêmes, les applications pour attirer ou repousser les insectes dans des zones spécifiques ou pour perturber leur accouplement ont rapidement augmenté en tant que stratégie de lutte antiparasitaire [77]. En outre, ces produits permettent de capturer les insectes qui propagent les maladies, de déterminer le moment et la nécessité des applications d'insecticides, de suivre la population et la dispersion des ravageurs, de détecter ainsi que de surveiller les ravageurs (attractifs ou synergiques) [78].

4. Contexte réglementaire des pesticides et biopesticides

L'évaluation, avant mise sur le marché, des produits phytopharmaceutiques et des substances actives qui les composent est strictement encadrée et harmonisée au niveau européen par le règlement CE n° 1107/2009.

Ce règlement fait partie, d'un ensemble de textes législatifs, appelé « Paquet pesticide ». Le « Paquet pesticide » comprend également une directive 2009/128/CE instaurant un cadre communautaire d'action pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable [79-80].

On peut souligner le dynamisme du marché du biocontrôle en Europe. En effet, L'UIPP (Union des industries de la protection des plantes) mentionne une croissance de 24% du marché du biocontrôle en France en 2018. La dernière mise à jour de la liste des produits phytopharmaceutiques de biocontrôle établie par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) au titre des articles L.253-5 et L.253-7 est parue le 18/06/2019 sur le site du BO du Ministère en charge de l'agriculture. Cette liste compte désormais 481 produits, dont 332 sont des substances naturelles et 92 des micro-organismes. Ce document précise également les phrases de risques (mentions de danger pour la santé et l'environnement) qui sont interdites pour les produits phytopharmaceutiques de biocontrôle.

En France, depuis 2009, le plan Écophyto vise à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires (communément appelés pesticides) tout en maintenant une agriculture économiquement performante. La seconde phase (Ecophyto 2) met l'accent sur une meilleure diffusion des solutions alternatives.[80-81].

Ce contexte est favorable au développement de produits alternatifs et signifie que les contrôles effectués sur les productions d'agrumes exportées en Europe vont répondre à des normes plus strictes.

Ainsi, ces dernières années, les restrictions à l'utilisation de nombreux pesticides synthétiques tels que les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les organophthalidés ont entraîné une demande accrue en biopesticides jusqu'alors utilisés exclusivement dans l'agriculture biologique [82].

En Europe, les agrumes sont soumis à la réglementation en vigueur sur l'étiquetage des fruits. Il s'agit d'une disposition du règlement européen n°543/2011 du 7 juin 2011 relatif aux fruits et légumes qui oblige les Etats membres de l'Union européenne à mentionner sur les colis des agrumes qu'ils commercialisent la liste des agents conservateurs et/ou les autres substances chimiques utilisés en traitement post-récolte. Il s'agit le plus souvent des substances suivantes :

- biphényle et diphényle, conservateur lisible sur l'étiquette sous le n° E 230 (quantité maximale autorisée = 70 mg/kg) ;

- orthophénylphénol et orthophénylphénate de sodium, lisible sur l'étiquette sous les n°s E 231 et E 232 (quantité maximale autorisée = 12 mg/kg seul ou en mélange exprimé en OPP) ;
- esters glycériques de résine de bois E 445 (quantité maximale autorisée = 50 mg/kg ;
- ajoutons les produits suivants : gomme Karaya (E 416), cire d'abeille (E 901), cire de candelilla (E 902), cire de carnauba (E 903), shellac (E 904), esters de l'acide montanique (E 912), cire de polyéthylène oxydée (E 914) etc.

Pour réduire les impacts sur la santé de la population et de l'environnement, l'utilisation des biopesticides est encouragée et leur efficacité vérifiée pour conserver des rendements de récolte élevés [60].

Grovermann et coll. (2017) ont étudié plusieurs stratégies [83], pour inciter à l'utilisation de biopesticides, notamment des subventions ou des taxes sur les pesticides synthétiques en fonction du degré de toxicité.

Toutefois, la spécificité élevée des biopesticides peut limiter leur action, comme les biopesticides basés sur le champignon *Coniothyrium minitans* qui ne vise qu'un seul genre de pathogène (*Sclerotinia spp.*) [84] et ceux basés sur la bactérie *Serratia entomophila*, qui ne contrôlent qu'un seul insecte ravageur [85].

La biodégradabilité caractéristique des biopesticides réduit les problèmes environnementaux, mais peut nuire au maintien de l'activité du produit après son application [86].

Malgré les difficultés rencontrées, l'utilisation de biopesticides devrait être priorisée par le fait que les pesticides synthétiques génèrent des résidus qui causent des conséquences diverses sur l'environnement [87] et causent des conséquences sanitaires diverses pour les agriculteurs qui les manipulent [88].

Il y a donc un besoin en recherche pour optimiser la production de biopesticides en maintenant des cultures végétales rentables et durables [89-90]. En France, la recherche dans ce domaine se structure à travers plusieurs organismes dont une académie du biocontrôle et de la protection biologique intégrée et un groupe francophone d'étude des pesticides organiques d'origine naturelle (PO₂N). L'association a pour vocation de fédérer les différentes expertises du biocontrôle et d'être force de proposition de solutions alternatives respectueuses de l'environnement. Le groupement

francophone permet aux chercheurs de partager des connaissances et de diffuser les différents travaux réalisés sur les molécules ou extraits naturels utilisés en protection des cultures.

L'objectif est d'identifier un réseau d'acteurs capable de proposer des solutions alternatives respectueuse de l'environnement.

5. Utilisation des algues marines comme biopesticides

Les produits naturels recherchés visent notamment des propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes. Les composés naturels présents dans les extraits d'algues sont susceptibles de répondre aux cahiers de charge d'un biopesticide destiné au traitement des agrumes.

Compte tenu de la richesse des côtes libanaises en algues, l'exploitation de cette matière première végétale apparaît comme une opportunité pour l'élaboration de formulations pour lutter contre le *Penicillium digitatum*.

5.1. Généralités sur les algues marines

Les algues marines constituent un groupe diversifié d'organismes et sont divisées en microalgues et macroalgues. Le premier groupe comprend les cyanobactéries procaryotes et les microalgues eucaryotes [91]. Les algues sont des organismes très diversifiés du point de vue de la taille (des microalgues unicellulaires aux macroalgues multicellulaires) [92]. Les algues marines constituent des ressources renouvelables. Elles sont définies comme des plantes non vasculaires qui forment des producteurs primaires dans l'océan. Elles sont classées en trois grands groupes fondés sur la pigmentation, l'anatomie, la morphologie et la composition biochimique comme les algues brunes (Phaeophyta), les algues rouges (Rhodophyta) et les algues vertes (Chlorophyta) [93].

Les algues ont une grande diversité dans la composition biochimique qui est liée aux caractéristiques physiologiques et biochimiques [94]. Il y a plus de 15 000 métabolites primaires et secondaires qui ont été produits au cours de différentes voies métaboliques des algues avec diverses applications (Tableau 4)

Il a été rapporté que les algues possèdent des composés présentant un potentiel antimicrobien contre les pathogènes d'importance médicale, agricole et environnemental. Ainsi, les activités antivirales, vermifuges, antifongiques et antibactériennes ont été détectés chez les algues vertes, brunes et rouges [95].

Tableau 4: Composés majeurs des extraits d'algues (Mayer et al., 2009).

Compound	Function	Application
Polysaccharides	Components of cell wall (fucoidan, alginate, laminarin)	Provide strength, flexibility, maintain ionic equilibrium, prevent from desiccation
Phenolics and phlorotannins	Not found in terrestrial plants Phenol rings in polyphenols act as electron traps to scavenge radicals	Antimicrobial, antioxidant, antiviral compounds that protect the algae from abiotic and biotic stress conditions, for example, phlorotannins that are formed from oligomeric structures and phloroglucinol
Protein, peptides, and essential amino acids	The contents vary	Antioxidative, but difficult to extract
Lipids	Polyunsaturated fatty acids (PUFA) (ω -3 and ω -6) – higher level than in terrestrial plants	Structural membrane lipids; important in human and livestock diet. Composed of glycerol, sugars, bases esterified with fatty acids (saturated or unsaturated (C12–C22))
Terpenoids and steroids	Carotenoids, xanthophyll, fucoxanthin, astaxanthin	Antioxidant, antiviral, anti-inflammatory activity, UV protection
Vitamins	A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinate, biotin, folic acid, pantothenic acid. Level depends on the season	—
Minerals	Se, Zn, Mn, Cu – structural components of antioxidative enzymes	—

5.1.1. Les algues vertes

Les algues vertes constituent le plus grand groupe d'algues. Ce groupe d'algues, appartient à l'embranchement des « Chlorophycées ». Il s'agit de 9 000 à 12 000 espèces poussant dans divers habitats d'algues vertes, de taille et de forme variables, comprend les formes unicellulaires (*Chlamydomonas*, desmids), coloniales (*Hydrodictyon*, *Volvox*), filamenteuses (*Spirogyra*, *Cladophora*) et tubulaires (*Acetabularia*, *Caulerpa* et *Ulva*). En milieu aquatique les algues

produisent leur propre nourriture et constituent donc un groupe paraphylétique. Elles se trouvent sur les niveaux supérieurs du littoral jusqu'à 10 mètres de profondeur dans l'océan Atlantique, la mer Noire, la méditerranée et l'océan Pacifique.


Comme les plantes, les algues vertes contiennent deux formes de chlorophylle, qu'elles utilisent pour capter l'énergie lumineuse nécessaire à la fabrication des sucres. Les pigments photosynthétiques (chlorophylles a et b, carotène et xanthophylle) ont les mêmes proportions que ceux des plantes supérieures. La cellule typique de l'algue verte, qui peut être mobile ou non, possède une vacuole centrale. Les aliments sont stockés sous forme d'amidon (l'amylopectine et l'amylose) dans des pyrénoides (noyaux plastifiés protéiques). Leur paroi cellulaire est constituée de polysaccharides sulfatés, galactanes sulfatés, xylanes et ulvanes [96-97].

6. La macroalgue verte *Ulva lactuca*

6.1. Généralités

L'algue *Ulva lactuca* ou « laitue de mer » est une macroalgue verte comestible, à distribution cosmopolite (très vaste) répandue dans l'océan atlantique et les mers attenantes. Elle peut se fixer sur différents supports solides telles que sur les roches, dans les zones littorales et sublittorales des régions côtières [98]. Espèce nitrophile, elle est un bioindicateur de l'eutrophisation d'un milieu. Cette algue est visible surtout aux fortes périodes d'ensoleillement, la fin de l'hiver, le printemps et l'été. Elle a une durée de vie assez courte, quelques mois en général, mais plusieurs générations se succèdent au cours de l'année [99]. Elle appartient à la famille des Ulvacea (tableau 5) [100].

Tableau 5: Classification de l'algue verte *Ulva lactuca* (Guiry et al. 2008).

Embranchement	Chlorophyta	
Classe	Ulvophyceae	
Ordre	Ulvales	
Famille	Ulvaceae	
Genre	Ulva	
Espèce	<i>Ulva lactuca</i>	

6.2. Localisation géographique au Liban

Ulva lactuca a été trouvée pour la première fois en avril 1991 à Beyrouth (Bitar, 1999, sous le nom d'*U. fasciata*). Kanaan et al. (2015) [101] ont identifié l'espèce à Batroun, El Manara, Saida, Tyre et Barbara en 2014. L'espèce est envahissante le long de toute la côte libanaise sur les récifs de Vermetid et dans des habitats peu profonds. *Ulva lactuca* a été le premier macrophyte marin envahisseur exotique identifié au Liban. Kanaan et al, 2015 [101] ont identifié 94 espèces d'algues qui poussent le long de la côte libanaise et on mit en place une carte des sites de collecte de ces espèces d'algues (Figure 8). De façon générale, on trouve *Ulva lactuca* autant en mer du nord, qu'en méditerranée ou en océan atlantique.



Figure 8: Carte des sites de collecte des algues le long de la côte libanaise (Kanaan et al, 2015).

6.3. Composition biochimique

La composition biochimique des algues marines est généralement connue pour être fortement influencée par les conditions environnementales locales (saison, pollution...) et l'emplacement géographique [102-103-104] . Riche en vitamine C (8 fois plus que l'orange), en vitamine A, calcium, chlorophylle, fer (2 fois plus que les germes de blé), magnésium (10 fois plus que les germes de blé), *Ulva lactuca* a une teneur élevée en protéines et est assez pauvre en lipides. Signalons que la liste des ingrédients INCI répertorie un extrait d'*Ulva lactuca* par le numéro CAS 97281-59-9, en tant qu'agent de protection de la peau [102-104] .

Les constituants biochimiques d'*Ulva lactuca* ont été étudiés par certains auteurs tels que Ismail et al. 2017 [105] qui a déterminé la composition du tableau 6.

Tableau 6: Composition biochimique d'*Ulva lactuca* collectée de la baie d'Abu-Qir en Egypte (Ismail et al.2017).

	Composition biochimique d'<i>Ulva lactuca</i> (%)
Protéines	25.52±2.12
Lipides	2.85±0.72
Humidité	75.56±3.24
Cendre	70.28±2.54

6.3.1. Les minéraux

Les algues contiennent dans leur composition de nombreux micro et macro-éléments, tels que l'iode, le zinc, le fer, le cuivre, le calcium et le magnésium, le sodium et le potassium, nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme humain. Leur teneur dans la biomasse atteint parfois 40%, davantage que dans n'importe quelle plante terrestre comestible (10 à 100 fois plus élevée que les légumes traditionnels) [104]. C'est pourquoi les algues constituent potentiellement une source riche en macro et micro-éléments.

El Said et al, 2013 [102] ont effectué une étude montrant la variation de la composition chimique de l'*Ulva lactuca* de la Côte égyptienne de la mer Méditerranée.

Les échantillons des algues étaient collectés dans sept sites (baie d'Abu Qir, El Montazah, Sidi Bishir, El Shatby, Port Est, El Mex Bay et 21 km) le long de la côte Méditerranée égyptienne

(Alexandrie) en avril 2011. Les résultats présentés dans le tableau 7 indiquent que dans un même emplacement géographique, la composition chimique est affectée par les conditions environnementales.

Tableau 7: Teneurs en éléments minéraux et en glucides chez l'*Ulva lactuca* issue des côtes égyptiennes (El Said et al, 2013).

Location	Ca (mg/g)	Mg (mg/g)	Na (mg/g)	K (mg/g)	F (mg/g)	Les glucides (mg/g)
Abu Qir	2.86	1.73	21.91	7.70	93.26	111.45
El Montaza	6.47	0.56	6.37	1.68	85.03	109.49
Sidi Bishir	1.89	1.14	21.69	7.23	89.20	115.39
El Shatby	2.34	0.28	1.46	1.21	88.94	112.76
Eastern Harbor	1.90	1.44	8.37	7.64	82.03	114.08
El Mex	2.79	0.28	6.04	1.45	128.23	111.45
21 Km	16.73	2.54	3.33	4.43	109.03	101.62

Chbani et al, en 2015 [106] ont analysé la concentration en macroéléments (éléments primaires et secondaires), en micronutriments de l'extrait liquide aqueux de Chlorophytae *Ulva lactuca* au Liban. La composition chimique est présentée dans le tableau 8.

Tableau 8: Concentration en macroéléments et microéléments de l'extrait liquide aqueux d'*Ulva lactuca* au Liban (Chbani et al. 2015).

		Concentration (mg/L)
Macroéléments		
Macroéléments primaires	Azotes (N) $\times 10^3$	126.09
	Phosphates (PO_4^{3-}) $\times 10^2$	3
	Potassium (K^+) $\times 10^2$	16.34
Macroéléments secondaires	Calcium (Ca^{2+}) $\times 10^2$	13.6
	Magnésium (Mg^{2+}) $\times 10^2$	36.9
	Sulfate (SO_4^{2-}) $\times 10^3$	0.262
Microéléments		
Chlorure (Cl^-) $\times 10^3$		8.35
Sodium (Na^+) $\times 10^2$		13.02
Alcalinité		
Carbonate (HCO_3^-) $\times 10^2$		10
Autres minéraux		
Nitrite (NO_2^-) $\times 10$		5.66
Nitrate (NO_3^-) $\times 10^2$		7.24

6.3.2. Les pigments

Les pigments d'algues peuvent être divisés en trois groupes principaux: la chlorophylle (chlorines et porphyrines) et les caroténoïdes (polyisoprénoïdes avec des cycles terminaux cyclohexane) et les phycobiliprotéines (tétrapyrroles ouvertes) sont des pigments liposolubles [107]. Les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) sont des pigments terpénoïdes produits par des algues marines, des plantes, des champignons et certaines bactéries, et sont les pigments les plus répandus dans la nature [108].

Ismail et al. 2017 [105] ont analysé les chlorophylles et les caroténoïdes dans *Ulva lactuca* collectées de la baie d'Abu-Qir, en Égypte (Figure 9). La chlorophylle totale constitue le taux le

plus élevé ($0,741 \pm 0,374 \text{ mg g}^{-1}$) en pigments. Les résultats d'une étude réalisée par Turan et al. (2015) [109] montre également que l'algue verte *U. lactuca* contenait des niveaux élevés de chlorophylle.

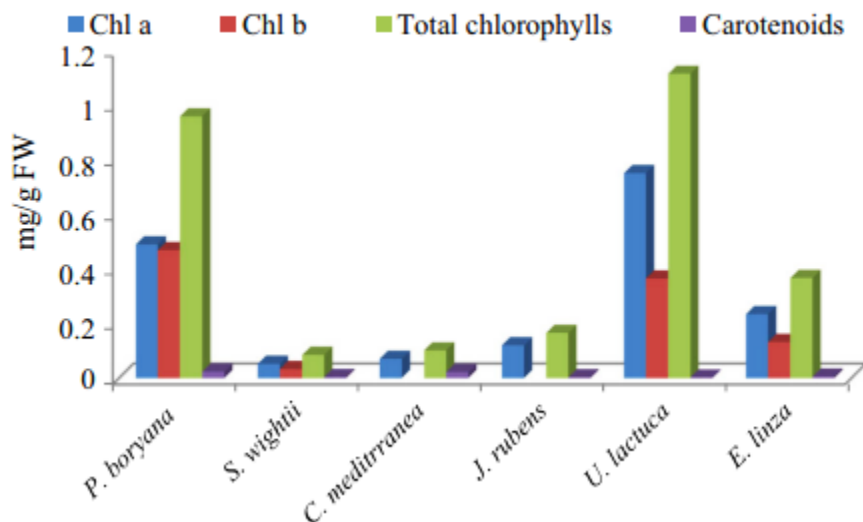


Figure 9: Teneur en pigments des algues étudiées par Ismail et al.2017.

6.3.3. Les polysaccharides

Les polysaccharides les plus abondants présents dans les algues vertes et surtout dans *Ulva lactuca* sont les ulvanes. Les ulvanes sont des polysaccharides sulfatés de la paroi cellulaire des algues marines vertes appartenant aux Ulvales. Ces polysaccharides sont responsables d'un large éventail d'activités physiologiques et biologiques telles que les activités anticancéreuses, anticoagulantes, antioxydantes, antifongiques et antitumorales [110].

La structure et la composition de l'ulvane dépendent fortement des conditions d'extraction [111]. Ces ulvanes sont composées en majorité de rhamnose et d'acide uronique, unités majoritaires auxquelles s'ajoutent du xylose et du glucose. Le taux de sulfates est assez élevé, autour de 30% [112].

Yaich et al. (2011) [113] ont évalué le profil des monosaccharides dans *Ulva lactuca*, le tableau 9 montre que le glucose et le rhamnose sont les plus abondants dans cette algue. La présence de rhamnose peut être attribuée au xylorhamnoglucuronane.

Tableau 9: Composition en monosaccharides de la macroalgue *U. lactuca* (Yaich et al.2011).

Neutral sugars	Content (%)
Glucose	17.24 ± 0.20
Rhamnose	7.40 ± 0.21
Xylose	1.93 ± 0.03
Galactose	0.35 ± 0.01
Mannose	0.29 ± 0.00
Arabinose	0.08 ± 0.00

6.3.4. Les protéines

Les lectines sont les protéines les plus abondantes dans *Ulva lactuca*. Ces composés sont capables de se lier aux glucides et participent donc à de nombreuses activités biologiques. Ils sont responsables du transport des enzymes cellulaires, de leur synthèse et de la régulation de l'activité des enzymes. Ils jouent également un rôle important dans la communication cellule-cellule. De plus, ces composés procurent des propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires [114].

Ulva lactuca collectée au large de la Norvège était riche en protéines, allant de 90 à 120 g kg⁻¹ DW. Les teneurs en protéines varient d'une étude à l'autre, cela peut s'expliquer en partie par les variations géographiques et saisonnières, mais aussi par les différences de méthodologie [115].

Tableau 10: Profil des acides aminés dans *Ulva lactuca* (Maehre et al.2014).

Essential amino acids of <i>Ulva lactuca</i> (g kg⁻¹ DW.)	
Threonine	6.2 ± 0.3 ^d
Valine	7.1 ± 0.1 ^d
Methionine	2.2 ± 0.1 ^d
Isoleucine	4.4 ± 0.2 ^c
Leucine	8.5 ± 0.3 ^c
Phenylalanine	6.0 ± 0.2 ^d
Lysine	5.1 ± 0.2 ^c
Histidine	1.6 ± 0.1 ^{cd}
Tryptophan	n.a.
Non-essential amino acids (NEAA)	
Aspartic acid	9.0 ± 0.3 ^c
Serine	5.9 ± 0.3 ^c
Glutamic acid	12.2 ± 0.5 ^c
Proline	5.8 ± 0.5 ^c
Glycine	7.3 ± 0.2 ^c
Alanine	10.1 ± 0.3 ^{de}
Cysteine	1.0 ± 0.2 ^{de}
Tyrosine	3.4 ± 0.4 ^c
Arginine	6.0 ± 0.3 ^d
Sum TAA	101.5 ± 3.9 ^c
Relative amount	40.3 ± 0.4 g
EAA (%)	
Chemical score	0.92

6.3.5. Les lipides

Kendel et al. 2015 [116] ont rapporté que la teneur en lipides dans les algues vertes et spécifiquement *U. lactuca* est faible. Elle varie de 0.3% jusqu'à 3 % selon l'origine des algues (Tableau 11).

Yaich et al. (2011) [113] ont étudié le profil des acides gras dans *U. lactuca* issue de Tunisie et Chili (Tableau 12). Les acides gras saturés (AGS) et polyinsaturés (AGPI) représentent respectivement 68,97% et 6,73% des acides gras totaux. Dans l'échantillon étudié, l'acide gras le plus abondant est l'acide palmitique C16 : 0 (59,4%).

Tableau 11: Teneur totale en lipides de différentes espèces d'algues *Ulva* (kendel et al.2015).

Phylum	Algal Species	Location	Date	Reported Levels (%)	
Chlorophyta	<i>Ulva</i> sp.	Beach in Plestin-les-Grèves, France	June 2012	0.6% dw	
		north-east part of the Black Sea (Feodosiya and Karadag Bays, Crimea)	July 1987	0.2% dw	
	<i>U. lactuca</i>	Coast of Abu Qir Bay near Boughaz El-Maadya (Egypt)	April, August and October 2010	4.0% dw	
		Buleji beach of Karachi coast	Different seasons at low tide	1.2% dw	
		Littoral between the area of Téboulba and Sayada (Monastir-Tunisia)	July 2007	7.9% dw	
	Chlorophyta	<i>U. lactuca</i>	Indian Sundarbans	September 2007– June 2008	0.3%–1.0% dw
			Bohai Sea near Weihai (China)	August	1.2% fw
			Bodega Bay, California	November 1995	3.1% dw
			Coast of Norway	May and June 2012	2.6% dw
			Coast of the Persian Gulf (Iran)	-	3.6% dw
Ria de Aveiro			October 2012	0.3% dw	
<i>U. rigida</i>		north-east part of the Black Sea (Feodosiya and Karadag Bays, Crimea)	July 1987	0.3% dw	
		Varvara, Bulgaria	October 2011	0.8% fw	
<i>U. fenestrata</i>		Pacific Ocean in the Northern part of Canada	-	0.5% la	
<i>U. pertusa</i>		Bohai Sea near Weihai (China)	August	0.9% fw	
Chlorophyta	<i>U. lactuca</i>	Gujarat coast, India	March–October 2011	0.7%–2.0% fw	
	<i>U. fasciata</i>				
	<i>U. taeniata</i>				
	<i>U. pertusa</i>				
	<i>U. reticulata</i>				
	<i>U. beytensis</i>				
	<i>U. compressa</i>				
	<i>U. rigida</i>				
<i>U. linza</i>					
<i>U. flexuosa</i>					

Tableau 12: Profil en acides gras d'*Ulva lactuca* (Yaich et al.2011).

Fatty acid	Methyl ester (%)
Myristic C14:0	2.40 ± 0.10
Palmitic C16:0	59.40 ± 0.56
Palmitoleic C16:1	6.87 ± 0.23
Stearic C18:0	1.87 ± 0.11
Oleic C18:1	15.93 ± 0.50
Linoleic C18:2	2.43 ± 0.05
α-Linolenic C18:3	3.20 ± 0.17
Arachidic C20:0	1.13 ± 0.10
Eicosenoic C20:1	1.52 ± 0.05
Behenic C22:0	4.17 ± 0.05
Docosahexenoic C22:6	1.10 ± 0.05
SAFA	68.97 ± 0.86
MUFA	24.32 ± 0.78
PUFA	6.73 ± 0.27

Ortiz et al. (2006) [117] ont également rapporté que les principaux acides monoinsaturés présents chez *U. lactuca* sont les acides oléique, palmitoléique et éicosénoïque. Les variations des teneurs en acides gras sont imputables aux différences environnementales et génétiques.

7. Méthodes de prétraitement et d'extraction appliquées aux algues

7.1. Généralités

Les algues, riches en composés actifs, sont en mesure de contribuer à différentes activités biologiques. Ces composés sont sensibles aux techniques d'extraction. De nos jours, les recherches dans le domaine des algues marines visent à sélectionner des techniques d'extraction efficaces, sélectives et respectueuses de l'environnement [118].

Le choix de la méthode d'extraction dépend notamment du type de composés bioactifs à obtenir (huiles, polysaccharides, éléments nutritifs, fibres alimentaires, etc.).

Concernant les extractions par solvant, le choix de solvant (polaire, apolaire, protique, aprotique) conduira à l'extraction de différents groupes de composés [119].

Les méthodes de production d'extraits d'algues peuvent être divisées en trois groupes : méthode biologique (hydrolyse enzymatique), extraction par solvant et extraction physique (en autoclave, par fluide supercritique).

7.2. Prétraitement de la biomasse d'algues et de la procédure d'extraction.

Dans le cas de la préparation d'extraits d'algues marines, la première étape (immédiatement après la collecte) consiste à laver plusieurs fois la biomasse à l'eau de mer pour éliminer les particules de sable et les impuretés qui y adhèrent [120].

Rhimou et al. (2010) [121] ont suggéré de supprimer la microflore de surface en trempant les échantillons d'algues pendant 10 min avec de l'éthanol à 30%. Ensuite, les algues devraient être rapidement transportées au laboratoire dans des sacs en polyéthylène placés dans une glacière. Les algues devraient être à nouveau lavées avec de l'eau douce pour éliminer les précipités de sels. Il convient de veiller au maximum à éliminer les épiphytes des macroalgues [118]. Après le processus d'extraction, la matière végétale est filtrée, le filtrat (extrait d'algue) est recueilli et conservé à 4 ° C.

Le schéma général du prétraitement de la biomasse algale et de la production d'extraits d'algues par des méthodes biologiques et chimiques est présenté à la figure 10.

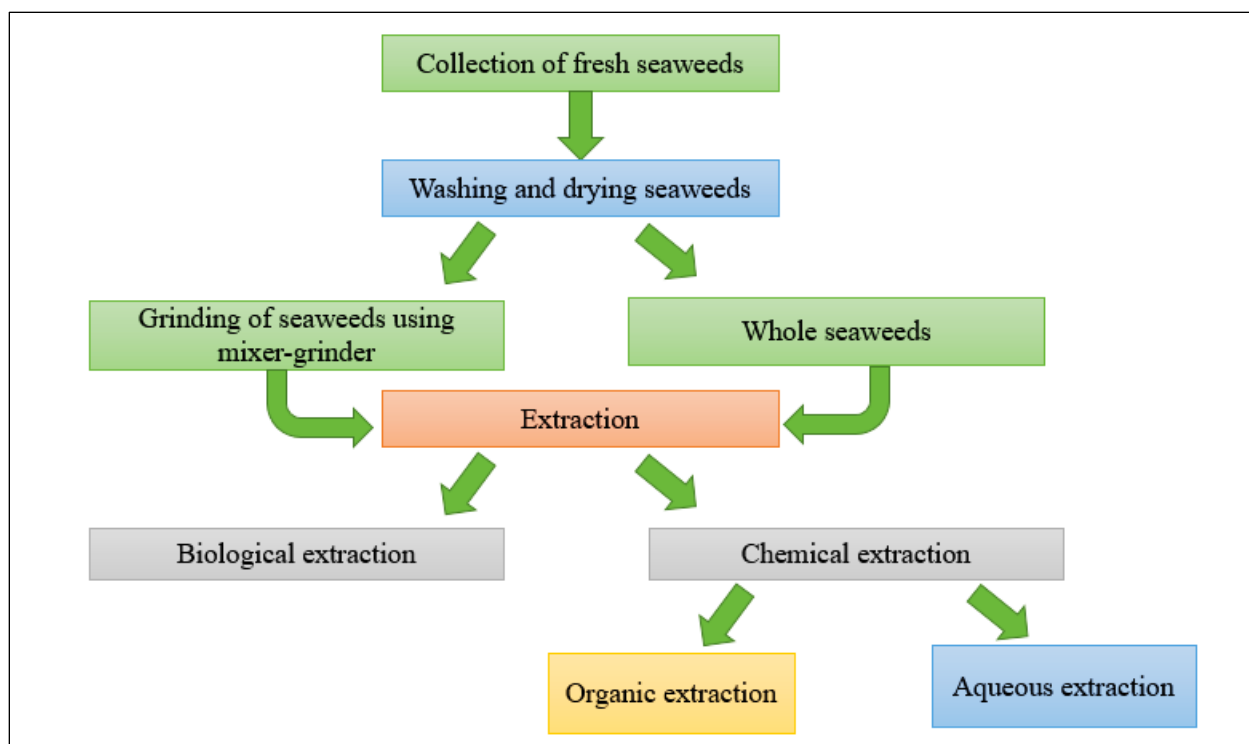


Figure 10: Schéma général du prétraitement de la biomasse algale et de la production d'extraits d'algues.

Le tableau 13 ci-dessous récapitule quelques exemples de solvants d'extraction utilisés pour réaliser des extraits à partir de la biomasse algale.

Tableau 13: Extraction par solvant à partir de la biomasse algale.

Biological active compound	Method of extraction		Extractant
Polysaccharides	Solvent extraction	Organic solvent	Ethanol
			Methanol
		Inorganic solvent	CaCl ₂ , HCl, Na ₂ CO ₃
			Distilled water
			H ₂ SO ₄ , HCl, H ₃ PO ₄
Phenolic compounds	Solvent extraction	Organic solvent	Methanol
			n-Hexane, Chloroform, ethanol, methanol, acetone
Proteins		Inorganic solvent	water
Lipids	Solvent extraction	Organic solvent	Chloroform/methanol (1/2 or 2/1)
			Chloroform/methanol/50mM phosphate buffer (1/2/0.8)
			Dichloromethane/methanol (2/1)
Pigments	Solvent extraction	Organic solvent	Acetone, ethanol, methanol

7.3. Extraction par solvant

Les techniques d'extraction utilisées pour obtenir les substances bioactives sont les procédés de macération, d'extraction par Soxhlet ou l'extraction par fluide supercritique (SFE) [122-123].

Le choix d'une méthode d'extraction particulière dépend de la quantité et de la nature des composés à isoler. La sélectivité dépend de la nature du solvant et des solutés.

Macération à froid :

La biomasse est mise en contact avec le solvant pendant au moins 3 jours avec une agitation régulière. Le marc (matière solide) est filtré et pressé, le filtrat est clarifié par décantation [124].

L'efficacité de cette méthode est basée sur la récupération élevée des composés avec une durée courte [125].

L'acétone est le solvant souvent le plus utilisé pour l'extraction des antioxydants et des chlorophylles. Les composés lipophiles sont extraits avec des solvants organiques non polaires, tels que l'hexane ou des solvants peu polaires tels que le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle. Les constituants hydrophiles, y compris les lignines, sont extraits avec des solvants polaires tels qu'un mélange acéto-méthanol ou avec l'éthanol [126].

Macération à chaud

Il s'agit notamment d'une macération avec de l'eau distillée préalablement portée à ébullition. Un milieu aqueux est utilisé pour extraire les fractions hydrosolubles sans traitement à haute pression, sans apport d'acide fort ou d'une base [127]. Des agents de conservation de qualité alimentaire, à savoir l'acide acétique et / ou le carbonate de sodium, sont ajoutés pour stabiliser l'extrait [128].

Extraction de Soxhlet

L'extraction par Soxhlet à l'aide d'un solvant organique est une technique usuelle d'extraction de composés bioactifs à partir de biomasse. Pour ces conditions, la matière végétale est placée à l'intérieur d'une cartouche reliée à un ballon contenant l'extrait liquide, sous reflux de solvant. [129]. Cette méthode présente l'inconvénient d'être assez longue, mais représente souvent la méthode de référence.

Extraction par CO₂ Supercritique

L'extraction est effectuée à partir d'une matrice solide en utilisant le dioxyde de carbone dans son état supercritique, c'est-à-dire les conditions d'utilisation du dioxyde de carbone supercritique sont au-dessus de ses points critiques (température critique 31°C et pression critique 74 bars).

Le CO₂ à l'état supercritique permet de solubiliser des composés apolaires et de faibles masses moléculaires. Sa faible viscosité dynamique favorise les phénomènes de transport et de convection.

Une extraction dans ces conditions possède certains avantages : une faible température critique (T_c= 31,1°C), non inflammabilité et absence de toxicité et de solvant résiduel à la fin du traitement (évacuation sous pression atmosphérique), chimiquement inerte, sans processus d'oxydation du produit. La tension de surface et la viscosité sont plus faibles que celles des solvants organiques ce qui favorise la diffusion des solutés. Néanmoins, le CO₂ supercritique possède une très faible polarité. On est donc souvent amené à travailler sous des pressions très élevées ou alors à accroître le pouvoir solvant par l'ajout d'un co-solvant polaire tel que l'éthanol [130].

8. Activités biologiques de l'*Ulva lactuca*

Comme évoqué dans les parties précédentes, les algues vertes et en particulier *Ulva lactuca*, sont sources de composés désignés par métabolites secondaires tels que des caroténoïdes, des chlorophylles, des composés phénoliques, des protéines, des polysaccharides et des acides gras insaturés. Ces molécules ont déjà été signalées comme ayant diverses propriétés incluant l'activité anti-oxydante, antivirale, antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticytotoxique, anti-cancer ou antifongique [131].

8.1. Activité anti-oxydante

Les algues contiennent des molécules antioxydantes réactives, telles que l'ascorbate et le glutathion (GSH), ainsi que des métabolites secondaires, notamment les caroténoïdes (α et β -carotène, fucoxanthine, astaxanthine), des acides aminés (mycosporine, glycine) et des catéchines (catéchine, menton épigallocatechiné), gallate, phlorotannins (phloroglucinol), eckol et tocophérol. Les propriétés antioxydantes des extraits d'algues sont généralement évaluées par mesure de l'effet inhibiteur sur le piégeage radicalaire de l'acide thiobarbiturique (TBARS) et du 1, 1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) [132].

Khairy et El-Sheikh (2015) ont évalué les teneurs en antioxydants de l'*Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) en utilisant la méthode du DPPH. Cette activité antioxydante a été corrélée à la présence de β -carotène et de composés phénoliques [104].

Whankatte et al. (2016) [133] ont évalué l'activité antioxydante de l'*Ulva lactuca* collectées sur la côte de Raigad à marée basse. Trois méthodes différentes ont été utilisées : le dosage par DPPH, le pouvoir réducteur et le contenu phénolique total. Les analyses ont montré la présence de flavonoïdes, de composés phénoliques, de saponines, tanins et carbohydrates. Les résultats indiquent qu'*Ulva lactuca* est riche en métabolites secondaires avec un potentiel antioxydant.

Dans le travail de Yaich et al. (2017) [134], une extraction en milieu acide ainsi qu'une extraction enzymatique ont été testées pour extraire les polysaccharides sulfatés d'*Ulva lactuca*.

Farvin et al. (2019) [135] ont comparé les activités antioxydantes de 26 espèces d'algues marines récoltées sur la côte koweïtienne du golfe Arabo-Persique, montrant l'activité anti-oxydante d'*Ulva lactuca*.

8.2. Activité anti-microbienne

Nan et al. (2008) [136] ont montré qu'*U. lactuca* présente des effets allélopathiques négatifs sur les microalgues nuisibles. Deveau et al. (2016) ont montré l'intérêt des extraits méthanoliques d'*Ulva lactuca* contre l'infection à Staphylocoques, en utilisant la méthode de diffusion sur disque gélosé.

8.3. Activité cytotoxique

Thuy et al. (2016) [110] ont étudié la structure de l'ulvane (les polysaccharides sulfatés hydrosolubles) de l'*Ulva lactuca* en utilisant différentes méthodes spectroscopiques et ont identifié une activité cytotoxique contre certains cancer.

8.4. Activité antifongique

Plusieurs algues vertes sont connues pour leur activité antifongique. Alang et al. (2009) [138] ont trouvé que les extraits par le n-hexane et par le chloroforme d'*Ulva lactuca* Linnaeus collectée d'Inde ont une activité antifongique contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Une autre étude

faites par Aruna et al. (2010) a évalué les activités antifongiques d'*Ulva lactuca* et *Ulva réticulata* contre les pathogènes fongiques *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Mucor indicus* [139].

Ertürk et Tas, 2011 [140] ont étudié l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait éthanolique des 3 algues vertes récoltées de la côte de Turquie, vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et de *Staphylococcus aureus*. D'autres travaux ont montré l'efficacité de l'extrait méthanolique d'*Ulva lactuca* pour lutter contre *A. Niger*, *P. digitatum* et *R. Solani* [141].

A ce jour, aucune étude n'a mentionné l'activité d'extraits d'*Ulva lactuca* sur *Penicillium digitatum*.

9. Contrôle post-récolte vis-à-vis de *P. digitatum*

Les agrumes sont atteints par divers agents pathogènes pendant la récolte et le stockage post-récolte, le transport et la commercialisation [142]. Les maladies fongiques post-récolte les plus sévères des agrumes sont les moisissures vertes et bleues causées par *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* Wehmer, respectivement [143].

La résistance aux agents pathogènes a motivé la recherche d'alternatives aux fongicides synthétiques. Cependant, les mécanismes de résistance aux maladies phytopathogènes des agrumes ne sont pas encore clairs. Une compréhension plus approfondie des mécanismes de résistance aux agrumes en réponse à des agents pathogènes communs est essentielle pour clarifier les mécanismes des interactions hôte-microbe et développer de nouvelles méthodes pour le stockage post-récolte, le transport et la commercialisation des agrumes [144].

Il a été rapporté que la résistance accrue des agrumes contre les infections à *P. digitatum* peut être obtenue par l'application de moyens physiques (rayonnement gamma, rayons ultraviolets) [145]. Youssef et al., (2014) ont également vérifié l'efficacité du carbonate et du bicarbonate de sodium comme inducteurs de résistance à la moisissure verte des agrumes [146]. Ainsi, Shi et al., (2018) ont montré que la combinaison du chitosan avec l'acide salicylique contrôle la pourriture verte dans les fruits du raisin [147]. Droby et al., (2002) ont montré que les microorganismes tels que les levures *Candida oleophila* ont une résistance contre le *P. digitatum* [148].

Les inducteurs de résistance sont des agents pathogènes ou des constituants végétaux qui réagissent avec les récepteurs des plantes et activent les défenses végétales, empêchant ainsi les infections pathogènes [149].

*9.1. Mécanisme d'action des composés alternatifs aux fongicides dans les agrumes sur *Penicillium digitatum**

9.1.1. Induction des enzymes de défense dans les tissus des agrumes.

Des recherches antérieures indiquent l'importance des substances naturelles pour lutter contre les maladies phytopathogènes des agrumes. Par contre les mécanismes d'action de ces substances au niveau des cellules végétales ne sont pas encore totalement élucidés.

Il a été décrit que certaines protéines liées à la pathogénèse (PR), comme les enzymes β -1, 3-glucanases appartenant à la famille PR-2, les chitinases appartenant aux familles PR-3,-4,-8 et-11 [150], les peroxydases et les phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) sont capables de dégrader les constituants des parois cellulaires fongiques.

- ***β -1,3-glucanase***

Les β -1,3-glucanases sont des enzymes hydrolytiques qui existent sous de nombreuses iso-formes et se différencient par leur activité enzymatique, leurs propriétés physiques et leur localisation subcellulaire chez les plantes. L'expression génique des glucanases peut être modulée en réponse à de nombreux processus physiologiques chez des plantes saines, mais également en réponse à des stress biotiques et abiotiques et les hormones végétales telles que l'éthylène [151].

La participation de β -1,3-glucanases dans la défense des agrumes contre les champignons pathogènes a été démontrée [154] et l'induction de l'expression d'un gène de classe I β -1,3-glucanases par blessure, irradiation à l'éthylène et aux UV qui pourraient favoriser la résistance des fruits aux agents pathogènes, chez le pamplemousse a été rapportée [152]. Les glucanases peuvent dégrader la paroi cellulaire fongique composée principalement de glucane, ce qui retarde la germination des spores et l'élongation du tube germinatif.

- ***Les chitinases***

Les chitinases végétales (EC 3.2.1.14) sont des protéines PR capables de dégrader la chitine de la paroi cellulaire fongique [153].

- ***Les peroxydases***

Les peroxydases jouent un rôle clé, lors de la synthèse de la lignine, qui agit comme un renfort de paroi cellulaire améliorant la résistance contre de multiples pathogènes, et altérant la capacité des agrumes à faire face à l'infection des *Penicillium* par l'activité antioxydante [144].

- ***Phénylalanine ammoniac-lyase (PAL)***

La phénylalanine ammoniac lyase (C.E. 4.3.1.5; PAL) (PAL) est une enzyme de la classe des phénylpropanoïdes à partir de laquelle la scoparone et la scopolétine sont synthétisées. Par conséquent, la scoparone a été considérée comme un bon marqueur de la résistance induite dans les agrumes [154]. En dehors de jouer un rôle important dans les propriétés de qualité des fruits (couleur, texture et saveur), les glucides sont impliqués dans la physiologie des agrumes, par exemple en fournissant le substrat pour la synthèse de divers métabolites secondaires, y compris celle des phénylpropanoïdes.

Ballester et al. (2010) [155], ont analysé l'activité enzymatique et les niveaux d'expression des gènes, de la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL), de la peroxydase, de la β -1,3-glucanase et de la chitinase dans le flavedo (partie colorée externe de la peau du fruit) et dans l'albedo (la partie interne blanche) du fruit afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la résistance des agrumes contre *Penicillium digitatum*. 24 heures après inoculation des oranges avec *P. digitatum*, les activités enzymatiques ont augmenté avec la résistance du fruit, en particulier chez l'albedo. L'expression du gène codant pour PAL et celle des gènes codant pour les isoformes basiques plutôt que pour les acides des protéines PR ont été induites dans les deux tissus, mais plus nettement dans l'albedo.

Les tissus d'oranges traités par des sels de carbonates ont montré une augmentation du niveau de l'activité enzymatique β -1,3-glucanase, peroxydase et PAL après 12 h de traitement [156]. En plus, les analyses HPLC ont montré une augmentation de la concentration des sucres et phytoalexins, particulièrement le saccharose et le scoparone.

De même, la moisissure verte des raisins a pu être contrôlée en induisant les activités des enzymes de défense comme phénylalanine ammoniac-lyase (PAL), la peroxydase, la β -1,3-glucanase et la chitinase [157].

9.1.2. Accumulation des espèces réactives oxygénées (ROS)

L'une des réponses de défense les plus rapides engagées à la suite de la reconnaissance des agents pathogènes est la «rafale oxydative», qui constitue la production d'intermédiaires d'oxygène réactifs (ROIs), principalement de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et de H_2O_2 , au site de tentative d'invasion [158]. La demi-vie d' $O_2^{\cdot-}$ est inférieure à une seconde. La protonation d' $O_2^{\cdot-}$ peut produire le radical hydroperoxyde HO_2^{\cdot} , qui peut convertir les acides gras en peroxydes lipidiques toxiques, détruisant les membranes biologiques. En outre, en présence d'ions métalliques divalents tels que le Fe^{2+} le H_2O_2 peut subir la réaction de Fenton, produisant le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), l'espèce la plus réactive connue en chimie. Ce ROI peut initier la peroxydation lipidique auto-perpétuant et endommager les acides nucléiques et les protéines [159]. Il est bien connu que dans des conditions de stress différentes, des quantités élevées de ROS, y compris l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peuvent causer la mort de l'agent pathogène, en interférant avec son cycle de vie, et provoquant plusieurs changements structurels [160].

Les mitochondries étant responsables de la majeure partie des ROS intracellulaires, leur niveau est souvent accompagné d'un dysfonctionnement mitochondrial, caractérisé par un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale et par conséquent une diminution de l'adénosine triphosphate cellulaire (ATP).

9.1.3. La perte d'intégrité de la membrane

La perméabilité et l'intégrité de la membrane plasmique cellulaire servent de fonctions importantes pour maintenir la viabilité fongique [161]. Des études antérieures ont montré que la lipophilicité des huiles essentielles entraîne une perméabilité membranaire accrue (perturbation des protéines membranaires), une inhibition de la respiration, une altération des processus de transport ionique chez les champignons et induit la perte d'autres contenus cellulaires [162].

Pour les champignons, l'intégrité de la membrane plasmique joue un rôle crucial dans le maintien des constituants cellulaires, car la membrane plasmique est généralement un site d'action pour les substances organiques antifongiques, telles que les protéines antifongiques et le chitosane [163-164].

Des études antérieures ont démontré le rôle important du citronellal qui est un composé volatil de l'huile essentielle des arbres parfumé au citron. Cette molécule pourrait inhiber la croissance de *Candida albicans* en affectant l'intégrité membranaire et en arrêtant le cycle cellulaire. La croissance de *P. adametzii* et *P. citrinum* pourrait être complètement inhibée par le citronellal à une dose de 112 mg/L [165].

En plus, Liu et al. (2010) [166], ont rapporté que le silicium (Si) qui est un composé inorganique, inhibe la germination des spores, l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne de *P. digitatum* en perturbant la membrane plasmique des spores en les endommageant. Les pertes en protéines et en sucres sont significativement plus élevées dans les mycéliums traités par le silicium que pour le contrôle.

Dou et al. (2017) [167], ont démontré l'activité antifongique de l'octanal qui est un aldéhyde aliphatique dans les huiles essentielles. Il représente une alternative potentielle aux fongicides chimiques dans le contrôle de la maladie post-récolte des agrumes. L'octanal à différentes concentrations (0, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 µl/ml) a inhibé la croissance des spores de *P. digitatum* d'une manière dose-dépendante. La morphologie et la perméabilité membranaire des spores de *P. digitatum* ont été visiblement altérées par 0,25 et 2,00 µl/ml d'octanal. D'autre part, l'octanal diminue le contenu lipidique total des spores de *P. digitatum*, ce qui indique que l'intégrité membranaire est endommagée.

Li et al. (2019) [168], ont montré que l'acide cinnamique a inhibé fortement la germination des spores et la croissance mycélienne de *P. italicum* dans les mandarines 'Orah'. Ils ont utilisé la coloration fluorescente de l'iodure de propidium, et ont observé une perte d'intégrité membranaire chez *P. italicum* après un traitement à l'acide cinnamique. En outre, l'acide cinnamique a conduit à la fuite des constituants cellulaires, y compris les protéines solubles et les glucides des hyphes de *P. italicum*.

9.2. Mécanisme d'action de *Penicillium digitatum* sur les cellules d'orange

Des études histopathologiques de tissus d'orange infecté par *P. digitatum* ont montré une déméthylation de la pectine, un gonflement de la paroi cellulaire et une plasmolyse des cellules en étroite proximité des hyphes. Barmore et Brown (1979) [169] ont attribué la plasmolyse cellulaire à la libération de solutés osmotiquement actifs et à l'augmentation de la concentration en H^+ qui est optimal pour l'expression et le fonctionnement de polygalactorunases fongiques. Les étapes initiales de développement des symptômes sont liées à une forte accumulation de l'acide D-galacturonique, qui a atteint une moyenne de 12 mg/g de matière fraîche dans les tissus infectés par *P. digitatum*. L'accumulation d'acide galacturonique et sa diffusion dans les tissus sains est considérée comme un facteur essentiel dans la pathogénicité de *P. digitatum*. Ce composé est capable d'induire le gonflement de la membrane cellulaire et contribue à la plasmolyse et d'autres symptômes observés. Tantaoui-Elaraki et al. (1994) [170] ont mis en évidence un extrolite sécrété par *P. digitatum*, la phenylalanine-proline diketopiperazine ayant un rôle dans la pathogénicité de ce champignon. Prusky et al. (2004) [171] ont signalé, lors de l'infection de l'agrume, que *P. digitatum* produit des quantités élevées d'acide citrique qui bloque la production d' H_2O_2 sécrété par ces agrumes infectés. Cette propriété améliore la pathogénicité de *P. digitatum* puisque la toxicité de H_2O_2 peut inhiber directement la croissance de ces agents pathogènes.

Pendant l'infection, les pathogènes végétaux nécrotrophes macèrent le tissu hôte en sécrétant des quantités significatives d'enzymes glucidiques actives (Carbohydrate-Active enzymes CAZYmes) qui contribuent à la dégradation des polymères de parois cellulaires végétales pour obtenir les nutriments nécessaires à son développement [172]. Parmi ces CAZYmes, le type le plus abondant de pectine est le homogalacturonan, un polymère linéaire de l'acide galacturonique D α -1, 4-lié, qui peut être modifié par l'acétylation et la méthylestérification.

D'autres pectines comprennent rhamnogalacturonan I et II, et xylogalacturonan. Les enzymes impliquées dans la dégradation du squelette de la pectine comprennent les polygalacturonases (PGs), le pectate et les lyases de pectine (PLs), les rhamnogalacturonases et les lyases de rhamnogalacturonase [173].

II. Partie 2 : Procédé de formulation des extraits

Les extraits d'algues sont riches en molécules actives dont les propriétés doivent être préservées au sein d'une formulation adaptée à l'application. Une formulation adaptée conditionne également les performances attendues.

A) Formulation en émulsions végétales

1. Emulsions végétales

1.1. Définition générale

L'émulsion est une classe de systèmes dispersés, composée d'au moins deux liquides non miscibles, l'un dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes. Ce sont des systèmes finement divisés qui sont caractérisés par le développement important d'une interface entre les deux liquides A et B non miscibles [174]. Ces systèmes sont thermodynamiquement instables et peuvent être stabilisés cinétiquement par l'ajout d'un émulsifiant qui va ainsi conférer des propriétés particulières à l'interface et jouer un rôle fondamental dans la stabilisation de l'émulsion. Les émulsions ne se forment pas spontanément ; un apport d'énergie par agitation est nécessaire.

Les émulsions sont utilisées dans plusieurs domaines [175]. Les produits à base d'extraits d'algues sont généralement destinés à l'industrie des engrais, des cosmétiques, de l'hygiène ou de la santé animale. Une émulsion véhicule les principes actifs vers la surface cible (cellules végétales, humaines ou animales).

1.2. *Types* *d'émulsion*

Les émulsions peuvent être classées en fonction de la répartition de la phase lipophile et hydrophile [176]. Le type d'émulsion dépend de plusieurs paramètres, tels que la nature des émulsifiants et la nature des phases [177]. Selon le choix de la formulation, et l'ordre d'ajout de ces composants, on peut obtenir des émulsions avec des caractéristiques différentes.

Il existe deux types d'émulsions : les émulsions simples et les émulsions multiples.

Les premières sont constituées d'une phase dispersée dans une phase continue. Lorsque la phase continue est une phase aqueuse et la phase dispersée est une phase organique (hydrophobe ou huileuse), ces émulsions appelées des émulsions directes, désignées par « huile-dans-eau » (H/E) (Figure 10 a). Les émulsions inverses « eau dans huile » (E/H) signifie que la phase continue est une phase huileuse et la phase dispersée est une phase aqueuse. (Figure 11 b).

Les émulsions multiples, quant à elles, consistent en une émulsion dispersée à son tour dans une phase continue externe. Elles sont alors du type E/H/E ou H/E/H (Figures 11 c et 11 d). Ce sont des systèmes complexes où les émulsions E/H et H/E existent simultanément. Dans le cas des émulsions E/H/E, les gouttelettes d'huile contiennent de plus petites gouttelettes d'eau, et les gouttelettes d'huile elles-mêmes sont dispersées dans une phase aqueuse continue. Les émulsions H/E/H consistent en de minuscules gouttelettes d'huile piégées dans des gouttelettes d'eau plus grosses, qui à leur tour sont dispersées dans une phase huileuse continue.

Aux fortes concentrations en huile, une émulsion E/H a tendance à se former, tandis qu'aux faibles concentrations en 'huile, une émulsion H/E se forme préférentiellement. Les émulsions multiples nécessitent généralement deux tensioactifs ou plus, l'une est principalement une émulsion primaire E/H stabilisante hydrophobe et l'autre est une émulsion secondaire H/E stabilisante hydrophile. Les tensioactifs hydrophobes et hydrophiles sont ajoutés respectivement dans la phase huileuse et dans la phase aqueuse continue, respectivement.

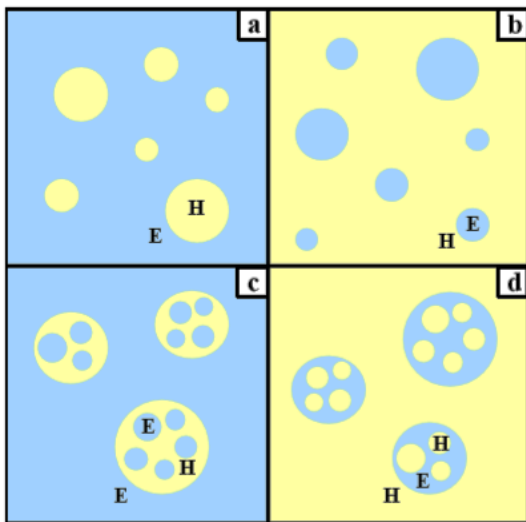


Figure 11: Représentation schématique d'une émulsion a : Huile-dans-Eau, b : Eau-dans-Huile, c : Eau-dans-Huile-dans-Eau, d : Huile-dans-Eau-dans-Huile.

1.3. Mécanisme de déstabilisation des émulsions

Au cours du temps, une émulsion évolue généralement vers l'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire vers une séparation appelée "démixtion" des phases, correspondant à une surface de contact minimale entre la phase aqueuse et la phase huileuse.

Les principaux mécanismes de déstabilisation d'une émulsion sont la sédimentation ou le crémage, la coalescence, la floculation, et le mûrissement d'Ostwald [178]. La vitesse et le mécanisme de la rupture de l'émulsion dépendent des compositions, de la microstructure, ainsi que des conditions environnementales (par exemple, la température, l'agitation mécanique et les conditions de stockage). Les types de processus de déstabilisation sont présentés schématiquement à la figure 12 et décrits dans les sections suivantes.

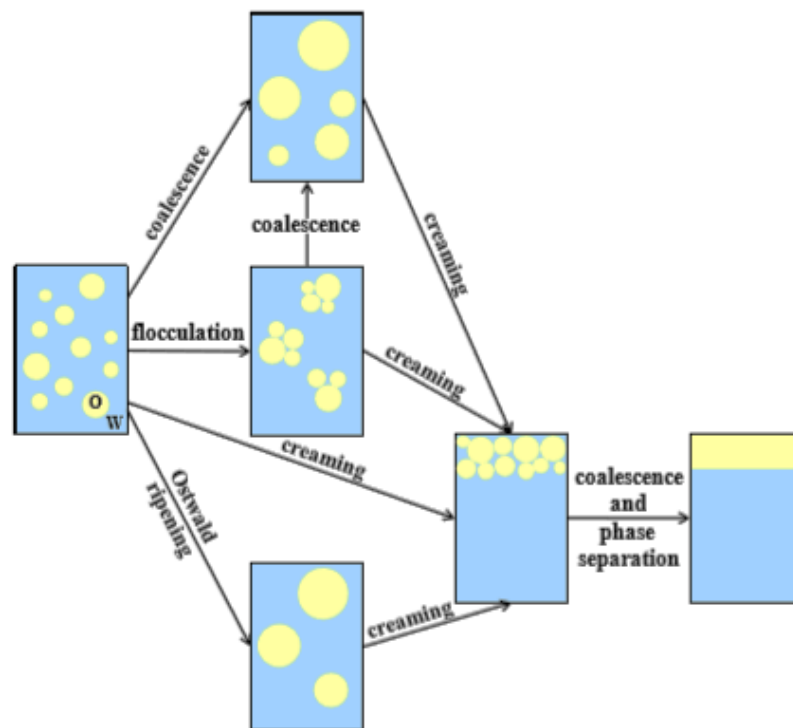


Figure 12: Représentation schématique des différents mécanismes de déstabilisation pour une émulsion huile dans l'eau.

La sédimentation et le crémage mènent tous deux à la séparation gravitationnelle. En général, les gouttelettes dans une émulsion ont une densité différente de celle de la phase continue. Si les gouttelettes ont une densité inférieure à celle du liquide environnant, elles ont tendance à migrer en surface, ce qui est appelé crémage. Inversement, si leur densité est supérieure à celle du liquide environnant, ils ont tendance à descendre, ce qui est appelé sédimentation.

Selon les masses volumiques relatives des phases, on aboutit généralement à un crémage (ascension de la phase huileuse pour une émulsion H/E) ou à une sédimentation (chute de la phase aqueuse pour une émulsion E/H) [179].

Ainsi, les gouttelettes dans une émulsion H/E ont tendance à crêmer, tandis que celles d'une émulsion E/H ont tendance à sédimenter.

Le mûrissement d'Ostwald est un phénomène irréversible de diffusion de molécules de la phase dispersée au sein de la phase continue. Il est gouverné la différence de pression entre les gouttelettes.

La surpression de Laplace (ΔP) (Equation 1) est supérieure dans les gouttes de petit rayon (R), ce qui induit un flux de matière tendant à vider les petites gouttes au profit des plus grosses. Ce phénomène est conditionné par la solubilité de la phase discontinue dans la phase continue et par la polydispersité des tailles des gouttes de la phase dispersée. Ce phénomène a pour conséquence la diminution du rayon des petites gouttes jusqu'à leur disparition complète et conduit ainsi à l'augmentation de celui des plus grosses, modifiant considérablement la granulométrie.

Equation 1:
$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R}$$

Il est important de noter que la déstabilisation n'est pas toujours indésirable. Elle peut être voulue et provoquée par exemple lorsqu'une molécule active doit être libérée au niveau de son site d'action. Une modification de la pression osmotique, du pH, l'application d'un cisaillement permet alors la déstabilisation de l'émulsion et la libération du principe actif qu'elle contient au moment voulu [180].

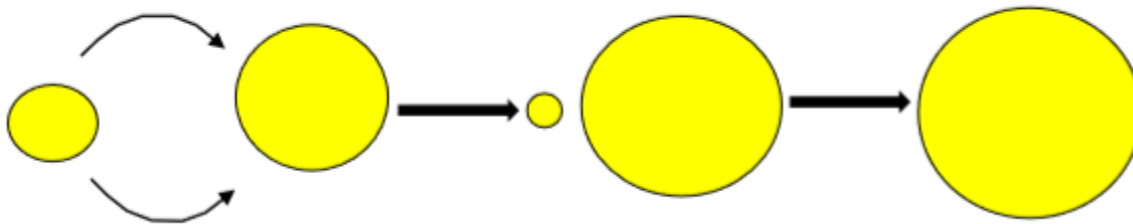


Figure 13: *Mûrissement d'Ostwald.*

Les gouttelettes en émulsion sont continuellement en mouvement en raison des effets de l'énergie thermique, de la gravité ou des forces mécaniques appliquées [181]. Après une collision, les gouttelettes peuvent se séparer ou rester agrégées. Les deux conséquences majeures de l'**agrégation** dans les émulsions sont la floculation et la coalescence [182].

La floculation est le processus par lequel deux gouttelettes ou plus se rejoignent. Lorsque la force de répulsion n'est pas assez forte pour séparer les gouttelettes, il y a agrégation des gouttelettes sans modification de la taille de la goutte principale. Tout facteur qui augmente la fréquence de collision augmente le taux de floculation. Ces facteurs sont le mouvement brownien, la séparation gravitationnelle et les forces mécaniques appliquées [183].

La coalescence est le processus par lequel deux gouttelettes ou plus se rassemblent pour former une seule gouttelette plus grosse. Dans les émulsions H / E, la coalescence conduit finalement à la formation d'une couche d'huile en surface [184].

1.4. Mécanisme de stabilisation des émulsions.

La stabilité des émulsions est gouvernée par de nombreux paramètres tels que le pH, la force ionique, le ratio phase/volume, la viscosité et la température. La stabilisation et la durée de la vie d'une émulsion sont conditionnées par la capacité de l'interface formée à maintenir la phase liquide dispersée dans la phase continue.

La viscosité de la phase aqueuse, lorsqu'elle est augmentée, permet de ralentir la migration des gouttelettes au sein de l'émulsion et donc de retarder la floculation, la sédimentation ou le crémage. La granulométrie de l'émulsion (taille et distribution de taille) dépend de la fraction

volumique de la phase dispersée, du procédé de fabrication et de la nature des interactions colloïdales (fréquence et efficacité des collisions).

Les émulsions ont besoin d'un agent stabilisateur pour stabiliser et réguler l'énergie en excès contenu par l'interface : Les émulsifiants, ce sont des molécules tensioactives de petite masse molaire ou des macromolécules capables de stabiliser les interfaces. Leur rôle est de faciliter la formation des gouttelettes en s'adsorbant à l'interface entre les deux phases. Les émulsifiants peuvent ainsi généralement diminuer la tension interfaciale, l'énergie à apporter au système pour former des gouttelettes et réduire leur diamètre afin de retarder les phénomènes de déstabilisation. Il existe différents types d'émulsifiants : les tensioactifs (TA), les particules solides et les chaînes de polymères.

Les tensioactifs

Les tensioactifs (TA) sont des molécules amphiphiles qui abaissent la tension interfaciale entre deux milieux non miscibles. Ils présentent au sein d'une même entité des groupements de polarités différentes : l'une à caractère hydrophile, l'autre à caractère hydrophobe. Les tensioactifs se rassemblent aux interfaces, en créant un film interfacial qui provoque la diminution de la tension interfaciale. Selon le volume respectif de leur partie polaire et lipophile, les tensioactifs ont une affinité plus ou moins grande avec l'eau ou l'huile.

Les TA sont répartis en **quatre classes** suivant la nature de leur partie hydrophile. **La première** est constituée des TA anioniques ayant une tête polaire chargée négativement (ex : le dodécyl sulfate de sodium ou SDS). **La seconde classe** comprend les TA cationiques dont la tête polaire est chargée positivement (ex : le bromure de tetradecyltrimethyl ammonium ou TTAB). **La troisième** classe contient les TA zwitterioniques ou amphotères dont la partie hydrophile est chargée à la fois positivement et négativement, conduisant à une charge globale nulle (cas du lauroamphodiacetate disodium). Enfin, **la dernière classe** est constituée des TA non ioniques qui ne possèdent pas de charge sur leur partie hydrophile tel que polyoxyéthylène sorbitan de monolaurate encore appelé Tween® 20).

Il existe une concentration seuil, appelée concentration micellaire critique (CMC), au-delà de laquelle les molécules tensioactives s'auto-assemblent pour former des micelles, ou agrégats supramoléculaires.

Lorsqu'un mélange d'huile, de phase aqueuse et de tensioactif est agité, l'émulsion qui se forme préférentiellement est celle dont la phase continue solubilise le tensioactif, conformément à la règle empirique de Bancroft [185]. Ainsi, l'émulsion préférentielle est de type H/E si le tensioactif est hydrosoluble et de type E/H si le tensioactif est liposoluble.

Parmi les tensioactifs lipophiles disponibles sur le marché, qui stabilisent les émulsions inverses (E/H) alimentaires, nous citerons les acides gras, les monoglycérides, le monooléate de sorbitan ou la lécithine.

Le monooléate de sorbitan (Span 80) est un émulsifiant monomérique non ionique et biosourcé. Il est obtenu à partir d'une réaction entre le sorbitol et les acides gras. Il est utilisé principalement dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique, ainsi que dans l'industrie alimentaire.

1.5. Procédés d'émulsification

La formulation d'émulsions se déroule généralement suivant quatre étapes [186]. La première consiste à mettre les différents constituants à la même température et à additionner l'émulsifiant dans la phase externe le plus souvent. La seconde comporte la pré-émulsification de la phase dispersée au sein de la phase continue avec des tailles de gouttes assez grossières. La troisième est une étape d'homogénéisation permettant la réduction de la taille des gouttelettes. Enfin, la dernière étape est une étape de refroidissement où peuvent être ajoutés des additifs permettant de corriger la viscosité, la brillance, la couleur...

La deuxième étape de pré-émulsification permet de disperser une phase dans l'autre. L'étape d'homogénéisation assurée par des systèmes homogénéisateurs (rotor-stator, haute-pression ou ultrasons) (Figure 14). Il existe également des procédés non mécaniques tels que la précipitation de la phase dispersée au sein de la phase continue, ou l'inversion de phase obtenue en ajustant la température [186].

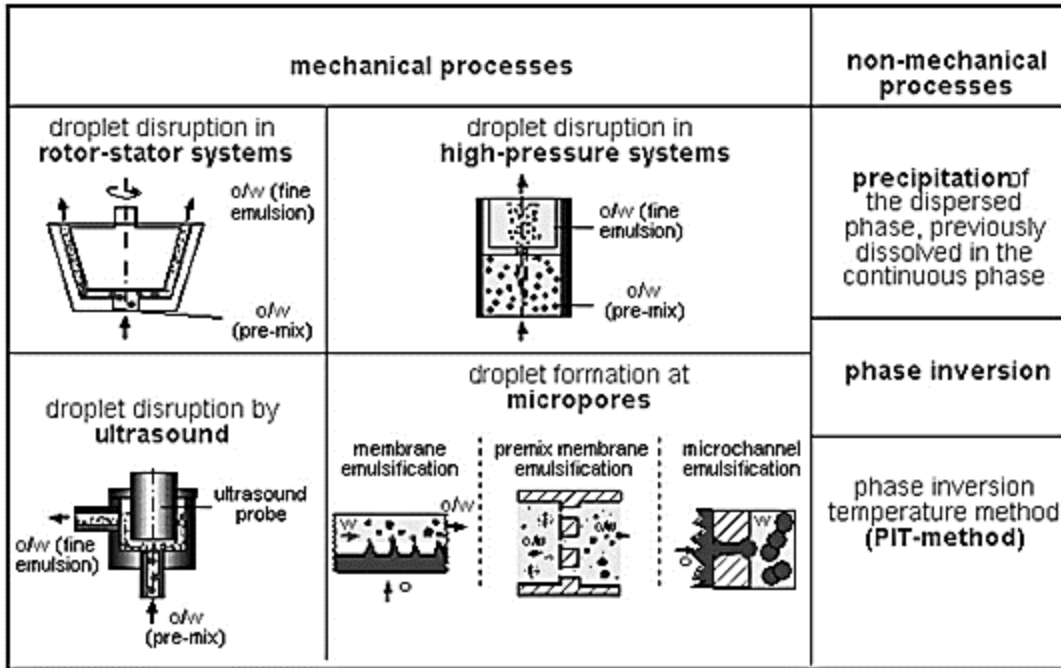


Figure 14: Représentation des différents procédés d'émulsification (Schubert et Engel, 2004).

1.6. Mesure de la stabilité d'émulsions.

Des modèles mathématiques développés peuvent être utilisés pour prédire la stabilité des émulsions vis-à-vis de la séparation par gravitation. Par exemple, la vitesse à laquelle une particule sphérique isolée dans un liquide idéal (newtonien) est donnée par la loi de Stokes (McClements, 2005)[189]:

$$\text{Equation 2: } v_{\text{Stokes}} = -\frac{2gr^2(\rho_2 - \rho_1)}{9\eta_1}$$

Où, v_{Stokes} est la vitesse de crémentation, r est le rayon de la particule, g est l'accélération due à la gravité, ρ est la densité, η est la viscosité de cisaillement, et les indices 1 et 2 se réfèrent à la phase continue et dispersées, respectivement. Le signe v_{Stokes} détermine si la particule se déplace vers le haut (+) ou vers le bas (-), c'est-à-dire si les particules crément ou sédimentent.

La stabilité d'une émulsion alimentaire au crémage peut être estimée à l'aide de la loi de Stokes. Par exemple, des gouttelettes de la phase huileuse de rayon 0,2 micromètre ($\rho_2 = 910 \text{ kg m}^{-3}$) en

suspension dans une phase aqueuse ($\eta_1 = 1 \text{ mPa s}$, $\rho_1 = 1000 \text{ kg m}^{-3}$) crémera à une vitesse de 0,68 mm par jour.

La cinétique de la séparation gravitationnelle d'une émulsion peut être suivie visuellement [188].

Pour mesurer l'indice de crémage, l'émulsion à analyser est placée dans un tube à essai transparent, doucement agité pour s'assurer qu'elle est initialement homogène, laissée pendant un certain temps (ou exposée à un stress environnemental spécifique), puis à la hauteur des limites formées entre les différentes couches est mesurée (Figures 15 et 16).

Idéalement, la couche du sérum doit être optiquement transparente, la couche d'émulsion doit avoir une apparence similaire à celle de l'émulsion d'origine, et la couche de crème doit être optiquement opaque. Le degré de crémage peut alors être simplement caractérisé par un indice de crémage (équation 3) :

$$\text{Equation 3: } CI = 100 \times \frac{H_S}{H_E}$$

Où, H_E correspond à la hauteur totale de l'émulsion et H_S à la hauteur de la couche de sérum. L'indice de crémage commence à zéro et augmente avec le temps, à mesure de la migration des gouttelettes.

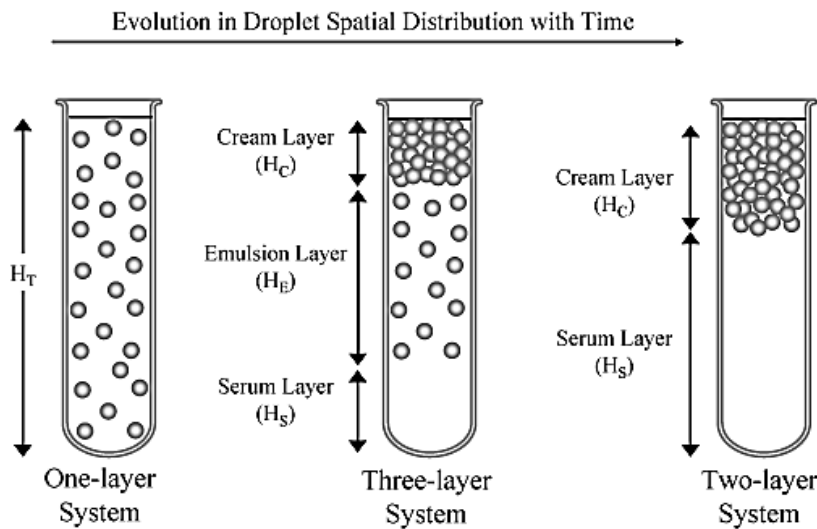


Figure 15: Représentation schématique de la distribution verticale des gouttelettes dans une émulsion huile dans eau instable à la formation de crème : (I) système initial (couche unique) ; (II) temps intermédiaires (trois couches) ; (III) système final (deux couches) (McClements, 2005).

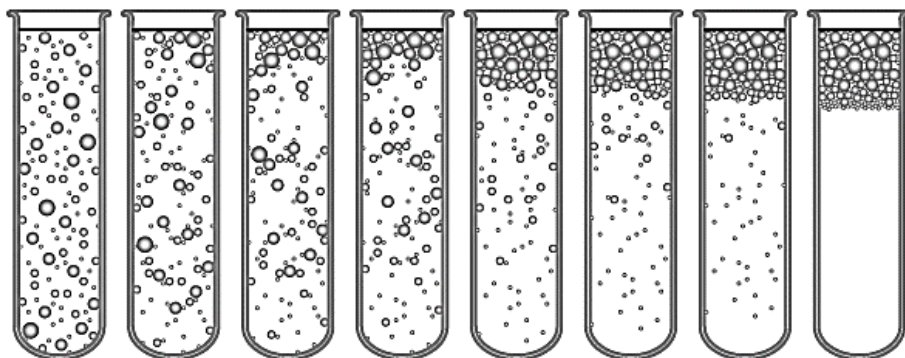


Figure 16: Représentation schématique du crémage dans une huile dans l'eau polydispersée.

1.7. Capacité émulsifiante d'un tensio-actif

La capacité émulsifiante (CE) d'un émulsifiant hydrosoluble est définie comme la quantité maximale d'huile pouvant être dispersée dans une solution aqueuse contenant une quantité spécifique de l'émulsifiant sans que l'émulsion ne se décompose ou ne soit inversée en une émulsion eau dans huile [189]. Expérimentalement, la CE est habituellement déterminée en plaçant une solution émulsifiante aqueuse dans un récipient et à l'agiter de manière continue à l'aide d'un mélangeur à grande vitesse, et en titrant de petits volumes d'huile. Le point final du titrage se produit lorsque l'émulsion se décompose ou est inversée, ce qui peut être déterminé par des mesures de conductivité optiques, rhéologiques ou électriques. Plus le volume est grand, plus la capacité d'émulsion de l'émulsifiant est grande. Bien que ce test soit largement utilisé pour caractériser les émulsifiants, il peut contenir un certain nombre de limites [189].

L'indice de stabilité des émulsions [190] est un paramètre largement utilisé par les chercheurs de l'industrie alimentaire depuis de nombreuses années. A l'origine, l'indice de stabilité de l'émulsion (ESI) était déterminé à partir de mesures de la turbidité d'une émulsion diluée réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde particulière :

Equation 5:
$$ESI = \frac{\tau(0)t}{\tau(t) - \tau(0)}$$

Où, $\tau(0)$ est la turbidité initiale de l'émulsion et $\tau(t)$ est la turbidité mesurée à l'instant t . Cette approche relativement simple doit être traitée avec prudence car il n'existe pas de relation mathématique simple entre la turbidité de l'émulsion et la taille des particules, en particulier dans la région où le rayon des particules est approximativement égal à la longueur d'onde de la lumière utilisée [187]. En effet, la turbidité de l'émulsion peut soit augmenter, soit diminuer en augmentant la taille des particules, en fonction de la taille initiale des particules. Il est donc recommandé de ne pas utiliser cette approche car il existe des méthodes beaucoup plus précises et fiables pour déterminer la stabilité de l'émulsion (par exemple, les particules).

1.8. Rôle des émulsions

La formulation des molécules actives sous forme d'une émulsion a pour but d'améliorer l'application et les propriétés des différents extraits actifs. Le développement des émulsions pour la protection des plantes ou le traitement des fruits a donné lieu à quelques travaux. Clause et coll. (2018) [191] ont préparé une émulsion inverse en utilisant le lécithine et le polyricinoleate de polyglycérol comme surfactants pour encapsuler les polysaccharides afin d'améliorer l'efficacité de la pulvérisation sur les feuilles des végétaux notamment les pommes de terre. YA Batta (2004) [192] a formulé des conidies de *Trichoderma harzianum* dans des émulsions d'eau dans l'huile avec Tween 20 pour inhiber la moisissure de la pomme bleue.

Lorsqu'une huile essentielle est la composition active, en raison de sa faible solubilité dans l'eau, elle peut être encapsulée dans une phase huileuse qui est dispersée dans l'eau avec un émulsifiant comme Tween-20 ou le triton-X100 [193-194]. Ribes et al. (2017) [195] ont encapsulé les huiles essentielles dans des nanoémulsions formulées avec Tween-20 et l'huile de tournesol pour améliorer l'activité inhibitrice vis-à-vis de la croissance mycéliale de *A. niger* et de la germination de spores.

2. Synthèse des tensioactifs

2.1. Choix d'une molécule plateforme

Certains acides organiques d'origine naturelle sont utiles pour la synthèse de molécules fonctionnelles, tels que des agents émulsifiants.

2.1.1. Acide citrique :

L'acide citrique ou l'acide 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylique est un triacide de formule $C_6H_8O_7$ (Figure 17). L'acide citrique se présente sous forme de cristaux incolores, translucides, assez friables, légèrement efflorescents ou sous forme de poudre cristalline. La production de l'acide citrique est d'environ 1,7 millions de tonne par an, avec 90% obtenues par fermentation et 10% d'origine synthétique à partir de l'acétone.

L'acide citrique peut être utilisé dans les domaines alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques. Dans l'industrie agroalimentaire (70%) en tant qu'acidulant dans les boissons, que conservateur dans les sucreries (E330) ou encore en tant qu'agent chélatant dans l'industrie de conserves. Il permet de préserver la couleur et prévient la décoloration des aliments en conserve [196]. Dans l'industrie pharmaceutique, l'acide citrique est utilisé comme anticoagulant, comme agent effervescent dans les dentifrices, ou encore comme complément de calcium sous la forme de citrate de calcium [197-198]. Le citrate de triéthyle (E1505) est listé au Codex alimentarius, comme émulsifiant et stabilisant. Il est également inséré dans la composition de produits cosmétiques et pharmaceutiques [199].

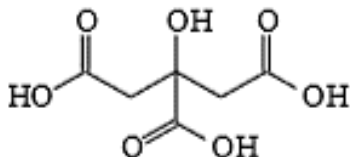


Figure 17: Acide citrique.

2.1.2. Acide aconitique

L'acide aconitique ou l'acide 1-propène-1,2,3-tricarboxylique ($C_6H_6O_6$) est un triacide aliphatique, insaturé. Il est l'acide majoritaire des mélasses et se retrouve également dans les vinasses. Peischier en 1820, a donné le nom d'acide aconitique lorsqu'il a été isolé de l'*Aconitum nappelus* et *paniculatum*. En 1877, il a été identifié dans les mélasses de canne à sucre par Behr [200]. Il est également présent dans les mélasses de betterave et dans de nombreuses céréales [201].

A l'état naturel, l'acide aconitique est un solide cristallisé blanc qui existe sous deux formes isomères ; la forme cis et la forme trans (Figure 18).

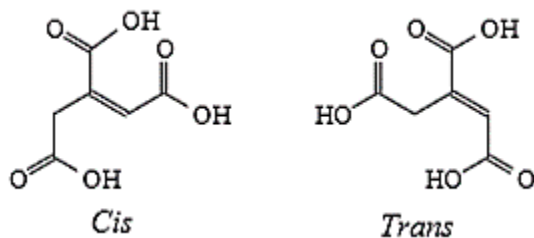


Figure 18: Forme cis et trans de l'acide aconitique.

L'acide aconitique, préparé industriellement par déshydratation de l'acide citrique par de l'acide sulfurique, a généralement la configuration trans. L'essentiel des données physiques se rapporte à cette forme. La forme cis est la plus rencontrée à l'état naturel car elle intervient dans le cycle de Krebs. Cependant, dans la canne à sucre, c'est la forme trans qui est prédominante due à l'action de l'aconitate isomérase [202].

L'acide trans-aconitique est la forme la plus stable donc moins réactive que l'acide cis-aconitique. Selon les travaux de Ambler et Roberts [203], l'équilibre cis-trans est influencé par le pH. Pour des solutions faiblement alcalines, c'est la forme cis qui prédomine alors que pour des solutions fortement acides ou fortement basiques, c'est la forme trans. En solution aqueuse, 85% d'acide sont convertis en forme trans à l'équilibre.

L'acide aconitique est employé comme acidulant ou exhausteur de la saveur de goût dans l'industrie alimentaire [204-205], comme herbicide en agriculture [206], contre les œdèmes en médecine [207]. En le combinant à des principes actifs, les dérivés d'acide aconitique trouvent des applications dans la cosmétique pour le traitement de l'herpès [208], ou en pharmacie pour ses propriétés antibactériennes et anti-tumorales ou encore anti-VIH. Piang-Siong et al. (2017) [209] ont évalué les propriétés de l'acide aconitique en tant que molécule antioxydante seule ou en tant qu'agent promoteur d'une formulation antioxydante contenant d'autres molécules antioxydantes connues.

L'acide aconitique peut être employé pour la synthèse de dérivés d'hydrazine qui sont utilisés dans des émulsions photographiques afin d'accroître la sensibilité et le contraste de ces émulsions. A

partir de l'acide aconitique, on peut également envisager la synthèse d'esters identifiés comme plastifiants d'une formulation de PVC [210].

2.2. Transformations en Chimie Verte

Jusqu'au début des années 90, les performances d'une réaction n'étaient jugées que sur son rendement sans se soucier des conditions de mises en œuvre.

Le concept de chimie verte a été développé dans les années 1990 aux Etats-Unis dans le cadre de la prévention de la pollution liée aux industries chimiques. En 1991, l'EPA (Environmental Protection Agency) est la première à donner une définition à la chimie verte :

La chimie verte a pour but de concevoir des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses.

Sheldon [211] a par la suite précisé cette définition, pour qu'elle soit applicable à une réaction de synthèse organique : La Chimie verte utilise efficacement des matières premières (de préférence renouvelables), produit peu ou pas de déchets, et évite l'utilisation de réactifs et solvants dangereux ou toxiques pour la fabrication et l'application de produits chimiques.

Les douze principes de la chimie verte, proposés par Anastas et Warner [212] en 1998 constituent un guide pour l'élaboration de synthèses plus vertes (Figure 19).



Figure 19: Les douze principes de la chimie verte.

En fait, la chimie verte contribue au développement durable, car elle repose sur trois piliers dits "EES" : l'environnement, l'économie et le social. En effet, il s'agit de répondre aux préoccupations des chercheurs et de l'industrie chimique pour concevoir de nouveaux procédés propres et innovants, qui permettent, de plus, d'améliorer l'image de la chimie auprès du grand public.

2.2.1. Indicateurs verts

Les chercheurs ont longtemps développé des procédés de synthèse efficaces sans se soucier du coût, de la toxicité des réactifs utilisés ou des sous-produits formés. Avec l'émergence du concept de la chimie verte, d'autres paramètres doivent donc être établis afin de mesurer l'impact environnemental des réactions chimiques.

Parmi les critères les plus utilisés, figurent le facteur environnemental (Environmental impact factor : E) développé par Sheldon [213], l'économie d'atomes (Atom economy : AE) proposé par Trost [215] et l'efficacité massique de réaction (Reaction mass efficiency : RME) [214].

Facteur environnemental (E-Facteur)

Le facteur environnemental (E-facteur) développé par Sheldon évalue l'impact environnemental :

$$E - Factor = \sum_i \frac{(m \text{ waste})_i}{(m \text{ product})_i}$$

Le calcul est basé sur la quantité de déchets produite par unité de masse.

Economie d'atomes

Depuis toujours, les chimistes ont caractérisé l'efficacité d'une réaction par son rendement et sa sélectivité. Trost, est le premier à développer le concept d'économie d'atomes afin d'inciter les chimistes à s'orienter vers des réactions. L'économie d'atomes quantifie la quantité de réactifs dans le produit final. La méthode de calcul ne tient pas compte du rendement. L'économie d'atomes est calculée à partir des masses molaires des réactifs et du produit mis en jeu. Pour une

réaction du type : $A + B \rightarrow C$, l'économie d'atomes se calcule de la façon suivante (cas de coefficients stœchiométriques égaux à 1) :

$$\text{Economie d'atomes} = \frac{M_{\text{produit } C}}{M_A + M_B} \times 100$$

Efficacité massique de la réaction

L'Efficacité Massique de Réaction (EMR) exprime le pourcentage de la masse des réactifs qui se retrouvent dans le produit. Donc pour une réaction du type : $A + B \rightarrow C$

$$\text{EMR} = \frac{\text{masse du produit } C}{\text{masse } A + \text{masse } B} \times 100$$

L'EMR évalue de façon globale les différents aspects d'une réaction verte.

2.2.2. Réaction d'estérification

La réaction d'estérification est une réaction usuelle en chimie. C'est pourquoi, elle a largement été étudiée et est toujours couramment utilisée dans l'industrie. Cependant, elle présente une cinétique assez lente. Il s'agit, de plus, d'une réaction limitée car réversible. Il existe plusieurs solutions pour améliorer les performances d'une réaction d'estérification. Notamment, l'utilisation d'un catalyseur homogène ou hétérogène associé à un apport thermique permet d'améliorer la cinétique.

Pour déplacer favorablement l'équilibre, il est nécessaire d'utiliser un réactif en excès et de soutirer l'ester ou l'eau produite, au fur et à mesure de sa formation. L'eau est le plus souvent distillée, piégée ou soutirée par un dispositif tel que la perévaporation [215]. On peut également introduire un composé déshydratant (tamis moléculaire, silice, zéolites...) au mélange réactionnel.

La production d'esters d'aconitate a été étudiée dans les années 50, puis plus récemment, leur synthèse en catalyse homogène a fait l'objet de plusieurs travaux [216-217].

2.3. Synthèse et applications d'esters biosourcés

Les acides organiques d'origine naturelle sont de potentiels candidats pour la synthèse d'esters biosourcés, biodégradables et non toxiques. Quelques auteurs ont étudié la conversion de l'acide

aconitique en esters. En 1949, un premier brevet américain mentionnait la préparation de l'aconitate de trialkyle en utilisant l'acide para-toluène sulfonique comme catalyseur et une distillation azéotrope de l'eau [218]. Ce brevet revendique d'excellentes propriétés notamment pour les aconitates de trilauryle et tributyle comme substances actives pour protéger les plantes contre les insectes, les champignons et les bactéries. D'autres applications ont été mentionnées pour les aconitates. Par exemple, De Oliveira et al. (2018) ont utilisé l'estérification de Fisher pour préparer des aconitates de dialkyle aux activités anti-inflammatoires [219]. D'autres brevets rapportent également la synthèse de citrates issus d'une estérification entre l'acide citrique et un alcool polyoxyalkylé, rentrant dans la composition de formulations de shampooing, en tant que surfactants [208]. Grigoryan et al. (2017) ont synthétisé des esters à partir de l'acide citrique avec des alcools aliphatiques après 20 h réaction à 150 °C. Ces esters de haute pureté ont été utilisés comme substituts alimentaires pour les huiles et les graisses comestibles [220].

Plusieurs esters d'acides naturels sont cités pour leurs activités antifongiques. Par exemple, l'acide quinique de 5-O-cafféoyle et certains de ses esters d'alkyle ont empêché la croissance des *Aspergillus* qui peuvent contaminer des récoltes de nourriture [221]. Suarez-Quiroz et coll. (2013) ont également observé une croissance inhibée de certaines levures pathogènes humaines par le *trans*-homoaconitate de triméthyle esters [222].

B) Formulations par microencapsulation

1. Microencapsulation

1.1. Définition

La microencapsulation regroupe un ensemble de technologies grâce auxquelles une substance active et/ou sensible, et sous forme solide, liquide ou gazeuse, est protégée par un matériau enrobant, via la formation de particules solides. Ce procédé, outre la protection des matières actives, permet également de protéger les utilisateurs dans le cas d'actifs irritants ou toxiques, ou encore de mieux contrôler la libération des molécules actives.

La microencapsulation a plusieurs finalités : La protection de la stabilité d'actifs sensibles (à l'oxydation, à la température, à l'humidité...) ; la conservation des molécules actives en formes solides, en poudres fluides ; le masquage d'odeur et/ou de goût des molécules encapsulées ; - la réduction de l'évaporation de matières actives volatiles.

La microencapsulation est très utilisée dans l'industrie alimentaire pour la préservation des propriétés fonctionnelles, l'amélioration de la manipulation et de l'utilisation des bioactifs [223-224].

2.2. Matière enrobant

Le système enrobant joue un rôle principal sur l'efficacité, de la stabilité des microparticules et sur le degré de protection de la matière active.

Le choix des matériaux enrobants est basé sur leurs propriétés physico-chimiques (stabilité, humidité, PH, oxydation), thermiques et mécaniques.

Il existe différentes matrices des microparticules :

Les polymères synthétiques : Comme l'acide polylactique, polystyrène, polyacrylate d'alkyle, polyuréthane... Ils sont généralement utilisés dans la médecine [224] et la pharmacie [225].

Les polysaccharides : Les hydrocolloïdes de type polysaccharide ont largement fait leur preuve dans le domaine de la microencapsulation et sont d'usage courant dans des nombreux secteurs d'activités (cosmétique, textile, pharmacie, agroalimentaire).

Les polysaccharides utilisés dans l'encapsulation sont l'amidon [226] , la maltodextrine [227] , la gomme arabic [228], le chitosan [229], la cellulose/éthyle cellulose [230], la pectine [231]. Les polysaccharides présentent un bon compromis entre le coût et l'efficacité, des propriétés organoleptiques et une variété de masses moléculaire.

Les protéines : Les protéines d'origine végétale (protéines des soja, protéines de blé...) et animale (protéines de lait, protéines d'œuf, caséine, gélatine) peuvent être employés comme matériaux enrobant en microencapsulation. Quelques exemples d'utilisation des protéines en microencapsulation : gélatine [232] , protéines de soja [233], protéine de lait [234], caséine [235]. Les protéines comme matériau enrobant en microencapsulation sont des matériaux biocompatibles

et biodégradables ; le caractère amphiphile des chaînes protéiques permet d'encapsuler des matières actives hydrophobes ou hydrophiles. La masse moléculaire élevée et la flexibilité de leurs chaînes permettent de bien enrober et de protéger la matière active. Les protéines ont de plus une bonne solubilité dans l'eau et des propriétés gélifiantes.

2.3. Les procédés de microencapsulation

Les techniques de microencapsulation sont variées. Elles sont classifiées selon leur coût énergétique, l'utilisation ou non de solvants organiques ou selon les domaines d'application. Cependant, la classification la plus courante est celle distinguant trois types de procédés : les procédés chimiques, les procédés physico-chimiques et les procédés mécaniques, comme présenté dans le Tableau 15 [236].

Tableau 14: Procédés de microencapsulation (Ré, 2006).

Procédés chimiques	Procédés physico-chimiques	Procédés mécaniques
<ul style="list-style-type: none"> • Polymérisation interfaciale • Polymérisation en milieu dispersé • Polymérisation radicalaire ou anionique • Inclusion moléculaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Évaporation-extraction de solvant (séparation des phases organiques) • Gélification thermique • Coacervation simple ou complexe (séparation de phase aqueuse) 	<ul style="list-style-type: none"> • Atomisation • Enrobage en lit fluidisé • Gélification de gouttes • Extrusion • Procédés basé sur la technologie des fluides supercritiques

Les procédés chimiques consistent en la polymérisation d'un ou plusieurs monomère(s) autour de la matière active (pure ou en solution) conduisant à la formation in situ d'une membrane de protection.

Les procédés physico-chimiques sont eux basés sur les différences de solubilité et les conditions de précipitation des matériaux enrobants. Il s'agit dans le cas de la coacervation, de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution par ajout d'un non solvant ou d'un polymère incompatible.

Les procédés mécaniques sont basés sur des technologies comme l'atomisation ou le lit fluidisé, qui sont des procédés de séchage, ou l'utilisation des fluides supercritiques et l'extrusion qui sont déjà utilisés en tant que procédés d'extraction, et qui sont détournés pour une application en microencapsulation.

2.3.1. Atomisation (ou spray-drying)

L'atomisation (ou spray-drying) est un procédé mécanique continu de séchage, qui permet la transformation d'une phase liquide en une poudre sèche. Cette technique est peu coûteuse, simple, rapide et largement utilisée industriellement dans des applications de séchage mais également de microencapsulation [237-238].

La préparation de la phase liquide en amont de l'atomisation est essentielle. Dans le cas de la microencapsulation, elle consiste à formuler principe actif (PA) et matériau enrobant dans un solvant (le plus souvent aqueux). Dans le cas où PA et matériau enrobant sont tous deux solubles dans le solvant, une solution sera obtenue [239]. Une étape d'homogénéisation est très souvent envisagée afin de stabiliser ces préparations liquides.

L'atomisation en elle-même consiste en la pulvérisation de cette phase liquide et à son séchage grâce à la circulation d'un courant d'air chaud au sein d'un appareil appelé atomiseur (Figure 20) [240]. La phase liquide est pulvérisée dans une haute tour appelée chambre d'atomisation via une buse d'atomisation. Le flux d'air chaud circulant à travers la chambre d'atomisation sèche les gouttelettes de solution et le solvant s'évapore. Le séchage est considéré comme effectif lorsque la température de la particule formée est égale à celle de l'air en sortie de la chambre d'atomisation. Le flux d'air chaud entraîne l'air chargé en molécules de solvant et les microparticules en direction du cyclone, pièce dont la géométrie permet la séparation et la récupération des microparticules dans un récipient appelé collecteur. L'air est évacué vers la sortie après passage à travers un filtre.

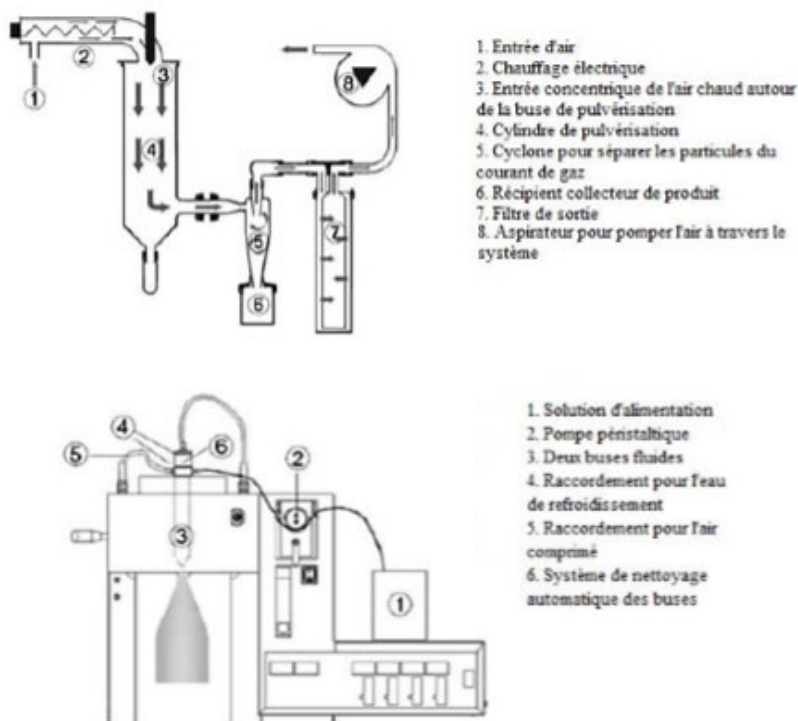


Figure 20: Présentation schématique du procédé d'atomisation (Murugesan and Orsat, 2012).

2.3.2. Efficacité de la matière enrobant et l'atomisation

Différents types d'agents d'encapsulation ont démontré leur efficacité pour protéger les molécules actives des extraits naturels par atomisation. On trouve les protéines [241-242] et divers glucides tels que la maltodextrine, l'amidon ou le chitosan [243-244].

Certains extraits de fruits tels que des grenades, des grignons de myrtille, des sous-produits de citron, ou tomates [245-248] ou d'autres extraits de feuilles [249-250] ont été encapsulés dans des polymères naturels pour préserver leur qualité et faciliter leur utilisation.

La biomasse des microalgues et l'huile d'algues ont également été encapsulées par atomisation [251-252] mais l'encapsulation d'extraits aqueux actifs des macroalgues l'algue verte *Ulva lactuca* n'a jamais été rapportée.

III. Conclusion

Cette étude bibliographique a permis de faire l'inventaire des informations disponibles sur la possibilité d'utiliser une algue verte pour lutter contre les maladies post-récolte des agrumes causées par le pathogène *P. digitatum*. La première partie a présenté des généralités sur la production des agrumes au Liban, ainsi que sur l'utilisation massive des pesticides chimiques dont les effets secondaires sont maintenant mieux connus. Il en découle la nécessité de développer de nouvelles méthodes de traitement par des biopesticides utilisant des molécules naturelles. L'utilisation d'une algue verte ressource disponible localement représente une opportunité de ressources agissant pour la protection des agrumes. Dans ce contexte, les caractéristiques connues de l'algue verte *Ulva lactuca* ont été présentées, ainsi que les activités biologiques déjà étudiées.

La deuxième partie évoque les procédés de formulation envisageables pour les extraits. La microencapsulation des extraits apparaît adaptée pour conserver et stocker les extraits d'algues en préservant leurs propriétés biologiques. Cette méthode utilisée pour les extraits naturels destinés à l'agro-alimentaire ou à la cosmétique a été peu étudiée pour des extraits d'algues. Par ailleurs, la formulation de l'extrait d'algue en émulsion offre la possibilité d'améliorer l'application et l'efficacité des fractions actives. Pour cela, des agents émulsifiants dérivés de l'acide aconitique ont été identifiés. Ces aconitates sont également cités comme molécules actives pour la protection des plantes (brevet allemand de 1949). Une voie de synthèse de ces molécules répondant aux principes de la chimie verte sera privilégiée.

Ce travail bibliographique a permis de cerner les enjeux du projet dans un contexte de développement durable et de dégager les principales questions scientifiques qui ont jalonné l'avancement des travaux.

- Quelles conditions d'extraction choisir pour l'obtention d'une fraction d'intérêt ?
- Quelle est la fraction, hydrophile ou lipophile, à cibler ?
- Quels sont les composés principalement à l'origine de l'activité fongique recherchée ?
- Comment stabiliser une émulsion contenant un extrait d'algue ?
- Quelle peut être l'influence de l'agent émulsifiant sur l'activité de l'extrait ?
- Quel est le mécanisme de résistance des cellules végétale à activer ?
- Comment agit le principe actif au sein de l'émulsion ?

Afin de pouvoir répondre à ces questions, plusieurs champs disciplinaires ont été mobilisés notamment la biochimie, l'analyse chimique, la physico-chimie et la microbiologie. Ainsi, ce travail s'est articulé en quatre parties :

- Etude de l'extraction et de la caractérisation des extraits en termes de compositions
- Evaluation du potentiel anti-fongique des extraits aqueux et organiques
- Microencapsulation des extraits aqueux – influence sur l'activité anti-fongique (tests in vitro)
- Formulation des extraits aqueux en émulsions – influence sur l'activité anti-fongique (tests in vitro et in vivo)

Chapitre 2 : Extraction de molécules d'intérêt et évaluation de leurs propriétés biologiques.

Article I. Utilisation des extraits de l'algue verte *Ulva lactuca* comme source de substances actives dans la lutte des moisissures vertes des agrumes après récolte.

Cette partie a été consacrée à évaluer le potentiel des molécules actives d'*Ulva lactuca* à être utilisée comme alternative pour protéger les agrumes contre les champignons après récolte. Ces algues sources de pigments, de polysaccharides, d'anti-oxydants et de protéines peuvent conduire à des extraits de compositions variables. L'objectif est d'identifier les extraits les plus riches en molécules actives.

L'étude débute par la sélection d'algues vertes « *Ulva lactuca* » de la côte Libanaise dont les propriétés seront comparées avec celles des algues de la même famille importées de Chine de qualité alimentaire ou agricole (Feed and Food grades). Les fiches techniques de ces échantillons d'*Ulva lactuca* séchées sont en annexe I. Certaines informations y sont mentionnées concernant les teneurs en lipides, en fibres, en protéines, en mannitol et en carotènes.

Les données bibliographiques ont mentionné que les principaux composants chez *Ulva lactuca* sont les sucres (sulfatés ou non) et les protéines, évalués respectivement à 24 % et 26,3 % de la biomasse sèche [253]. La teneur en lipides extraite par un mélange méthanol/dichlorométhane s'élève à quelques pourcents.

Une méthode d'extraction par macération a été choisie en privilégiant des solvants verts (eau, éthanol et acétate d'éthyle) et conduit à des extraits de compositions différentes (Figure 21). Des méthodes chromatographiques et spectrophotométriques ont été utilisées pour l'analyse des extraits.

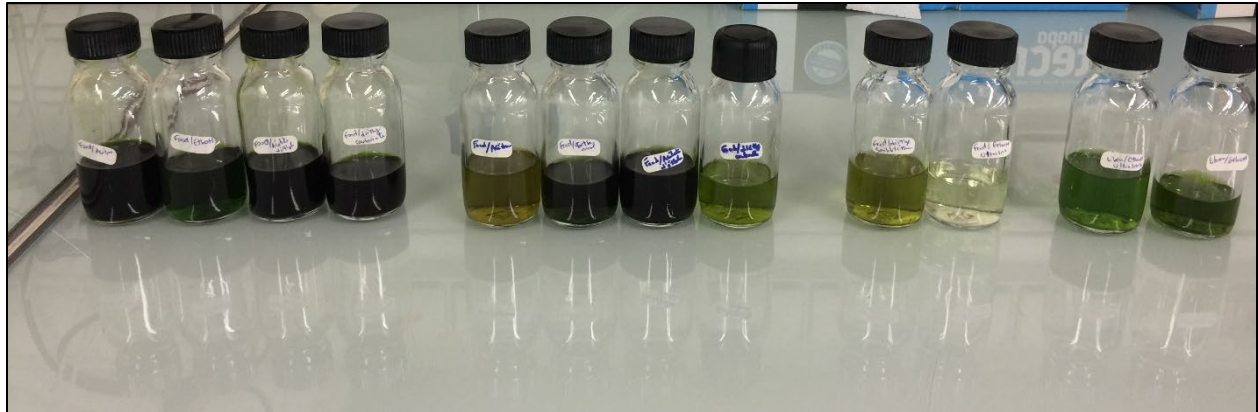


Figure 21: Extraits réalisés par macération dans l'eau, l'éthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle.

Nous avons également testée une extraction par SC-CO₂, méthode encore peu étudiée pour les algues. Parjikolaei et al., (2016) ont mis en œuvre ces conditions supercritiques pour extraire les caroténoïdes d'*Ulva lactuca*, avec un rendement d'extraction amélioré lorsque 5% d'éthanol est utilisé en co-solvant [254].

La cellule d'extraction a été remplie de 15 g d'algue sèche broyée (*Ulva lactuca* du Liban). La température de l'extracteur a été maintenue à 50°C, celle du séparateur fixée à 60°C. Une pression de 240 bars a été appliquée avec un débit de CO₂ de 80 mg/min.

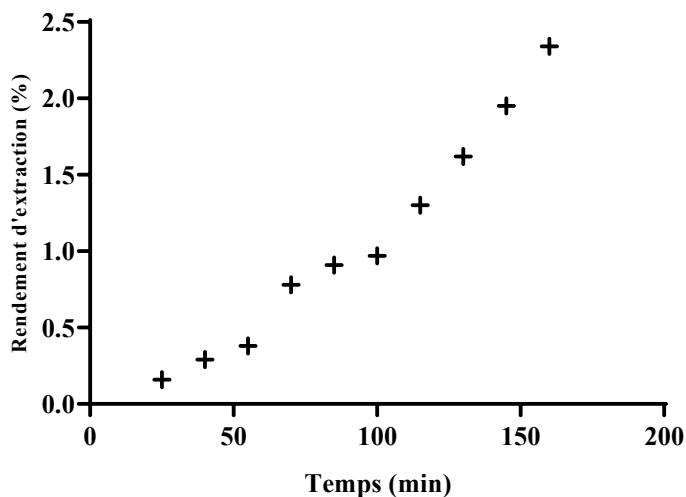


Figure 22: Rendements d'extraction de l'*Ulva lactuca* séchée ($P= 240^{\circ}\text{C}$, 80 mg/min).

Sur une plage de temps de 3 heures dédiée à cette extraction, un rendement de 2,5 % a été atteint (Figure 22). L'allure de la courbe montre que le rendement d'extraction maximum n'a pas été atteint, car il est probable que d'autres composés que les lipides aient été extraits. L'extrait obtenu est de couleur jaune pâle, ce qui indique que la chlorophylle n'a pas été extraite dans ces conditions. La cinétique d'extraction observée pour *Ulva lactuca* est plutôt lente. En effet, l'extraction de lipides de graines de fruit réalisée dans des conditions similaires a été achevée au bout de 2 heures.

Les fractions lipidiques extraites à l'acétate d'éthyle et par CO₂ supercritique ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse. Le protocole et un exemple de chromatogramme se trouve en **annexes 2 et 3**.

Pour les différents échantillons extraits à l'acétate d'éthyle (Tableau 15), les acides gras saturés (AGS) sont les plus abondants, avec une teneur entre 86 et 90 %. L'acide palmitique (C16:0) est l'acide principal des échantillons Food et Feed avec de teneurs entre 57–73%, tandis que l'acide arachidique (C20:0) atteint 56% pour l'*Ulva lactuca* du Liban.

Ulva lactuca de qualité Feed présente la teneur la plus élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI) and monoinsaturés (AGMI), ce qui confère à cet échantillon une qualité nutritionnelle intéressante.

Tableau 15: Composition en acides gras de l'extrait d'*Ulva lactuca* réalisé à l'acétate d'éthyle (en % relatifs).

Acides gras	Macroalgue		
	<i>Chinese Ulva lactuca</i>		<i>Lebanese Ulva lactuca</i>
	Food powder	Feed powder	
C10:0 acide caprique	8.0 ± 0	0.4 ± 0	0.8 ± 0
C14:0 acide myristique	1.2 ± 0	5.3 ± 0	0.6 ± 0
C16:0 acide palmitique	73.8 ± 0	57.4 ± 1.1	28.5 ± 0.1
C18:0 acide stéarique	4.1 ± 0	1.5 ± 0	0.4 ± 0
C20:0 acide arachidonique	3.6 ± 1.0	13.1 ± 0	56.3 ± 1.1
C16:1n-7 acide palmitoleique	2.7 ± 0	2 ± 0	2.2 ± 0
C18:2n-6c acide linoleique	6.7 ± 0	9.1 ± 0	11.1 ± 0
C18:1n-9c acide oléique	n.d.	11.29 ± 0	n.d.

Acides gras saturés	90.6 ± 0	77.6 ± 0	86.6 ± 0
Acides gras monoinsaturés	2.7 ± 1.0	13.3 ± 0	2.2 ± 0
Acides gras polyinsaturés	7 ± 0	20.4 ± 1	11.1 ± 0

Les extraits réalisés dans les conditions supercritiques présentent majoritairement de l'acide palmitique et stéarique. Plusieurs auteurs tel que Bhagavathy et al., (2011) ont remarqué que les fractions lipophiles des algues vertes riches en acide palmitique ont une activité anti-fongique [255].

Par ailleurs, la fraction polaire des algues vertes contient souvent des composés phénoliques qui apportent des propriétés anti-oxydantes [256]. C'est pourquoi, les teneurs en polyphénols des fractions aqueuse et éthanolique ont également été évaluées (Figure 23).

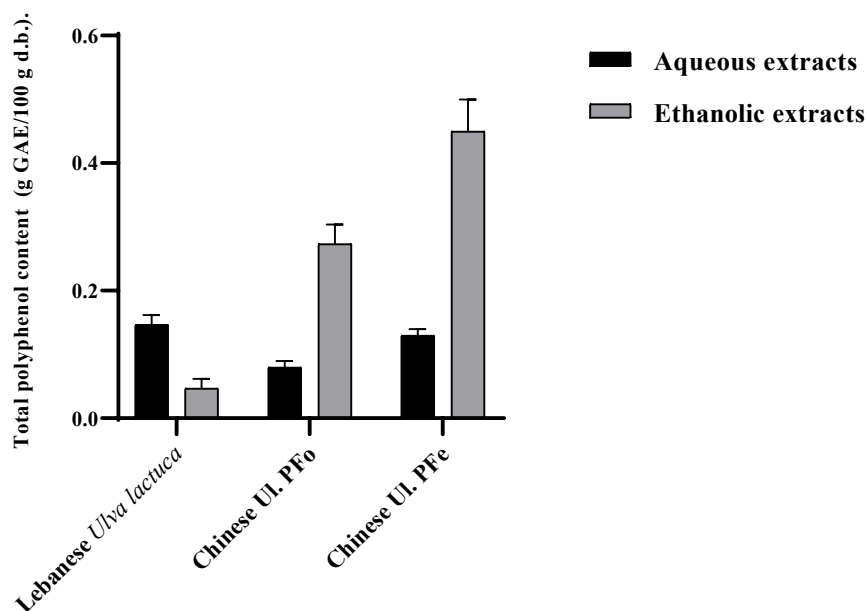


Figure 23: Teneurs en polyphénols totaux des fractions aqueuses et éthanoliques d'*Ulva lactuca*.

Les résultats montrent que les extraits éthanoliques des algues chinoises sont riches en composés phénoliques. Les composés phénoliques des algues chinoises sont de natures différentes de ceux de l'algue libanaise, car les affinités avec les deux phases ne sont pas les mêmes.

Enfin, a été évaluée la capacité des extraits aqueux d'algues (SAE) et des extraits organiques (SOE) à lutter contre les moisissures vertes des agrumes après récolte. Pour cela, quatre approches ont été utilisées : l'inhibition de la germination des spores de *Penicillium digitatum* sur le milieu de dextrose de pomme de terre (PDB), la viabilité des champignons sur la gélose à l'extrait de malt (MEA), l'adhésion des spores sur les cellules épidermiques des oranges et la méthode de diffusion sur disque gélosé.

Les résultats ont montré une inhibition de la germination des spores pour tous les extraits variants entre 70 et 87%, comparé à l'eau (contrôle négatif) et à la Nystatine (fongicide de référence). Une inhibition totale (CFU=0) de la viabilité de *P. digitatum* avec SAE et SOE a été montrée. Les extraits liquides d'algues (SLE) ont montré une faible adhésion des spores sur l'épiderme des oranges (Indice d'adhésion (IA) <10). La méthode de diffusion sur disque gélosé a montré que tous les extraits SLE sont actifs dans des proportions variables en fonction du solvant de référence. Les fraction ulvanes d'*U. lactuca* ont montré une inhibition maximale de croissance de *P. digitatum*.

Control of postharvest citrus green mold using *Ulva lactuca* extracts as a source of active substances

Douaa Salim^{1,2}, Pascale de Caro², Othmane Merah^{2,3}, Asma Chbani^{1,4}.

¹ Laboratory of applied biotechnology, Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, Lebanese University, Tripoli, Lebanon; douaa.salim@ensiacet.fr

² Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, Toulouse INP, France ; pascale.decaro@toulouse-inp.fr, douaa.salim@ensiacet.fr, othmane.merah@ensiacet.fr

³ Université Paul Sabatier, IUT A, Département Génie Biologique, 24 rue d'Embaquès 32000 Auch, France.

⁴ Faculty of Public Health III, Lebanese University, Tripoli, Lebanon; achbani@ul.edu.lb

* Correspondence: othmane.merah@ensiacet.fr, douaa.salim@ensiacet.fr, Tel: +33534323505

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, is responsible for 90% of postharvest losses. Chemical fungicides are responsible for damage to human health and the environment. For instance, the exploitation of green algae as a source of pigments and carbohydrate polymers has been the target of special attention. In this study, we evaluated the ability of *Ulva lactuca* extracts and their active molecules collected from Lebanon and imported from China for the biocontrol of postharvest citrus green mold. Seaweed aqueous extracts (SAE), organic extracts (acetone, ethanol and ethyl acetate) (SOE) and their chlorophylls and ulvans fractions of *Ulva lactuca* were studied. Four approaches were used to evaluate their antifungal properties: inhibition of the conidia germination of *P. digitatum* on potato dextrose broth (PDB), fungus viability on malt extract agar (MEA), adhesion of spores to epidermal orange cells, and the disk diffusion method. The results showed an inhibition of spore germination for all extracts ranged between 70 and 87%, compared to the control. A total inhibition (CFU=0) of *P. digitatum* viability with SAE and SOE was shown. Seaweed liquid extracts (SLEs) showed low adhesions according to the index adhesion (IA<10). The agar diffusion method showed that all SLEs had high inhibition zones ranged from 11 mm to 16 mm at the concentration of 50 g.L⁻¹. The separated chlorophylls (Chlorophyll a) and ulvan fractions showed a maximum growth spore inhibition. These findings are promising to develop safe and effective bioactive formulations for citrus fruit postharvesting protection.

Keywords: *Ulva lactuca*; green solvent extraction; chlorophylls, ulvan, anti-fungal activity.

1. Introduction

During storage, citrus fruit is frequently exposed to numerous postharvest diseases, generally caused by pathogenic molds, which usually infect the host after harvest, and during handling and/or processing [1]. Green mold caused by *Penicillium digitatum* is the most significant postharvest disease that affects citrus

fruit produced in Mediterranean climate countries, and it can lead to important financial losses during refrigeration, transport, and marketing [2]. To control this postharvest disease, several chemical fungicides have traditionally been used, including imazalil (IMZ), thiabendazole (TBZ) and sodium o-phenylphenate (SOPP) [3]. However, even though these products were successfully used over more than 25 years and were proven to be highly effective, the global tendency seems to be shifting towards a minimal use of chemical fungicides on produce, and hence, there is a need to pursue safer and more eco-friendly alternatives for reducing the decay loss in the harvested commodities [4-5]. In fact, the intensive use of chemical fungicides promote the development of resistant isolates of *Penicillium spp.* [6]. Moreover, increasing concerns regarding the residues of fungicides in the fruit, as well as the risks associated with their continued use, have prompted a search for safe and effective alternative strategies [7]. The use of fungicides has been efficient in decreasing loss due to the deterioration of food, but it also generates health and environmental concerns mainly due to the carcinogenic and/or teratogenic properties of the compounds, and their cumulative toxic effects.

Thus, it is of the utmost importance to developing new strategies for postharvest disease control, especially due to the increasing restrictions on the use of pesticides by regulatory agencies and consumer affairs institutions. Among these strategies, the action of natural substances from green macroalgae has received increasing attention in the area of postharvest pathogen management. The natural substances, which are present in green macroalgae, are pigments, polysaccharides, proteins, polyphenols and lipids. They could be used to treat plants with less environmental impacts [8-9].

Seaweeds have a wide diversity in their biochemical composition, which is related to their physiological and biochemical characteristics [10]. There are more than 15,000 primary and secondary metabolites that have been produced during different metabolic pathways of seaweeds with various applications [11]). The principal cell wall polysaccharides in green seaweeds are ulvan, they are the major constituents of green seaweeds cell walls representing 8 to 29% of the algal dry weight [12]. They are ramified acidic and sulphated polysaccharides constituted by a central backbone of disaccharide units formed by an L-rhamnose 3-sulphate linked to: (i) a D-guluronic acid residue (ulvabiouronic acid unit A); (ii) a L-iduronic acid residue (ulvabiuronic acid unit B); (iii) a D-xylose 4-sulphate residue (ulvabiose unit A); or (iv) a D-xylose residue (ulvabiose unit B) (Figure 1).

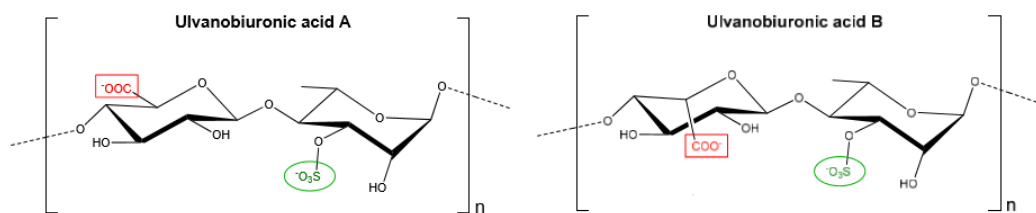


Figure 1: Disaccharide units of ulvabiuronic acid and ulvabiose in ulvans of green seaweeds.

Ulvan has already proven to be a remarkable polysaccharide with different attractive properties that make it suitable for a wide range of applications. In fact, this polysaccharide displays physico-chemical and biological properties of potential interest for diverse applications (food, pharmaceutical, agricultural, and chemical applications). Ulvans has demonstrated significant biological activities such as anti-cancer [13], [14], [10], anticoagulant [15], antioxidant [16], antiviral [17].

Few results concerning to the anti-fungal activities of green macroalgae *Ulva lactuca* have been reported. Methanolic and ethyl acetate extracts of *Ulva lactuca* collected from the Egyptian Mediterranean coast have shown a high antifungal activity [18]. Acetonic extracts of *Ulva lactuca* have shown inhibition

activity on *Penicillium purpurescens* [19], while ethyl acetate extracts of green algae have acted on the growth inhibition of virulent strains of bacteria and fungi pathogenic to humans [20]. The green seaweed *Ulva linza* showed a greater protection activity than the brown seaweeds *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* for protecting citrus fruits against the postharvest green mold *Penicillium digitatum* [21]. However, the antifungal activity of ulvan against *P. digitatum* on citrus fruit was not studied.

Therefore, the present study intended to estimate the variation in the biochemical constituents of extracts from the Chlorophyta *Ulva lactuca* collected from Lebanese coastal zones or imported from China. Green solvents have been selected to perform an eco-friendly extraction. *In vitro* tests have been implemented to assess the antifungal activities of *Ulva lactuca* liquid extracts (SLEs) and their fractions of chlorophylls and ulvan against *Penicillium digitatum*. A new methodology has been implemented to test the adhesion properties of spores, as their adhesion to orange cells is one of the first stages of the colonization and can be considered as the starting point of the infectious process. The objective is to evaluate the ability of these extracts to be as an alternative to chemical fungicides in the process of controlling postharvest phytopathogens in fruit.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Three different samples of *Ulva lactuca* were studied. Lebanese *Ulva lactuca* (Leb Ul.) was freshly and manually collected from a coastal zone of the Mediterranean, El Mina (34 ° 26 'N–35 ° 50' E) in Tripoli, Lebanon, on 1 May 2017. The algae were cleaned with seawater to remove unwanted impurities, then cleaned three times with distilled water and dried at room temperature until the mass remained constant. The samples were then stored hermetically at room temperature. Two other amounts of dried *Ulva lactuca* Food and Feed quality (Ch Ul. PFo , Ch Ul.PFe) were purchased from Fujian, Mainland China (Fuzhou Wonderful Biological Technology Co., Ltd.).

2.2. Preparation of seaweed liquid extracts (SLEs)

According to a previous study [22], the seaweed liquid extracts (SLEs) were prepared from 5 g of dried algae in 100 mL of solvent.

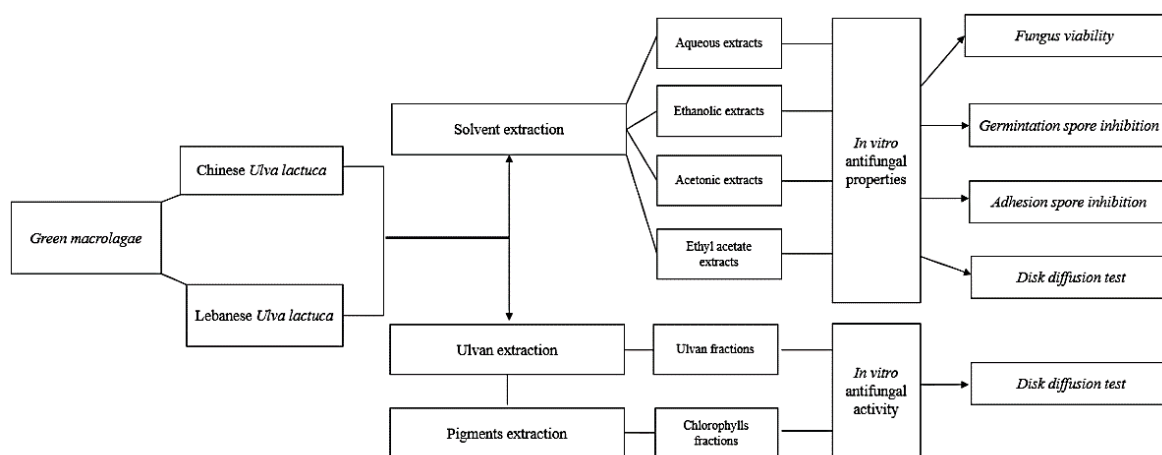


Figure 2: Strategy of *Ulva lactuca* up-grading in the present study.

2.2.1. Seaweed Aqueous extracts (SAE)

SAE was prepared according to Jiménez et al. (2011) [23]. Five grams of dried algae was put in a 100 mL flask. A volume of 100 mL of boiling Milli-Q water was added. The medium was stirred magnetically for one hour at room temperature. The extract was then filtered twice through a double layer of sterile muslin filter (20 cm x 20 cm). After filtration, water was evaporated to provide a dry material. The extracts were stored at 4 °C until analysis.

2.2.2. Seaweed Organic extracts (SOE)

Five grams of algal material were macerated in 100 mL of organic solvent at room temperature for a period of three days, with regular shaking (orbital shaker) [24]. After filtration, organic solvents (acetone, ethyl acetate, and ethanol) were evaporated under vacuum at 45 °C to produce a dry material. The extracts were stored at 4 °C until analysis.

2.3. Extraction of active molecules

2.3.1. Ulvan extraction

Twenty grams of dried seaweed were treated at room temperature with a 4:2:1 MeOH-CHCl₃-H₂O mixture to remove colored matter, filtered and vacuum dried to obtain defatted algal biomass [25]. This material was used to extract Ulva following the method of Mao et al. (2006) [26]. The resulting alga was placed into 400 mL of water. This solution was continuously stirred and kept at 80–90 °C in a hot-water bath for 2 h. The aqueous extract was centrifuged, and the liquid supernatant was filtered. The water extract was concentrated by a rotary evaporator to reduce the volume. The water extract was centrifuged, filtered and precipitated with 3 vol. of absolute ethanol. The alcohol precipitate was separated, washed several times with ethanol, and dried in a vacuum oven at 40 °C, then re-dissolved in distilled water, dialyzed against distilled water and freeze-dried to obtain highly purified ulvan.

2.3.2. Pigments extraction

Five grams of *Ulva lactuca* were homogenized in acetone (100 mL, 80%) and allowed to stand overnight in dark at 4 °C for complete extraction followed by centrifugation at 10 000 g for 5 min.

2.3.2.1. Fractionation of pigments by TLC

The pigments present in the acetone extracts were separated by the thin layer chromatography. on 10 × 20 cm silica gel plates (Sigma Aldrich). 5 µL of *Ulva lactuca* extracts were applied to 1 cm of the base of plate and developed with hexane/ acetone (75:25 v/v) [20]. The separated compounds were located and identified by visualizing plates stained with a UV lamp at 254 nm and 365 nm and observed pigments colors bands. The R_f values of pigments were measured and compared with the reports available for standard pigments.

2.3.2.2. Separation of Chlorophyll a and b

The separation of Chlorophyll a and b *Ulva lactuca*, was carried out by the method of differential solubility of pigments in organic solvents [27].

2.4. Characterization of SLEs, ulvans and pigments fractions

2.4.1. Pigments analysis with High Pressure Liquid Chromatography coupled with UV detector (HPLC-UV)

The acetonic extracts of *Ulva lactuca* were analyzed by an external calibration method using a Dionex-DAD-Ref Dionex-Refractometer diode (UltiMate 3000). The samples were diluted with methanol and filtered using a micro-filtration cartridge Polyray 0.45 micron to eliminate cell residues. The column (SunFir Wates) C₁₈ used was an apolar column (5 μm, 4.6 × 150 mm) with a pre-column. The temperature of the furnace was 50 °C, the injection volume was 20 μL and λ = 430 nm. The mobile phase was a mixture of solvent A (H₂SO₄ 5mM), B (acetone), C (H₂O) and D (pure methanol), according to a step gradient, lasting 30 min, which started from 55% B, changing at 62% in 1 min, rising up to 100% B at 15 min and 25% D. Then, the mobile phase composition was kept constant until the end of the analysis. Total acquisition time was 30 min. The analyzed compounds were identified by comparing their elution times with those of the standards.

2.4.2. Spectrophotometric scanning for chlorophylls fractions.

The chlorophyll fractions were scanned using a Thermo Scientific spectrophotometer. Triplicate scanning was performed in a 3-mL quartz cell in the range 400-700 nm. The degree of purity was defined as the relative percent of chlorophyll area peak to the total area of peaks determined either by a spectrophotometric scanning from 300 to 700 nm or by HPLC using absorbance measurements (430 nm).

2.4.3. Polysaccharide analysis by High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Five concentrations (5 mg. L⁻¹, 15 mg. L⁻¹, 30 mg. L⁻¹, 60 mg. L⁻¹, and 100 mg. L⁻¹) of standards (glucose, galactose, xylose, arabinose, rhamnose, fucose, mannose, mannitol, and sucrose) were dissolved in 1000 mL of Milli-Q water, and then 125 μL of fucose standard was added. One milliliter of aqueous extract was dissolved in 25 mL of Milli-Q water, and then 3mL of the solution with 125 μL of fucose standard was added to the vial, after filtration with the micro-filtration cartridge Polyray 0.45 micron.

Polysaccharides were analyzed by ion exchange chromatography with a CarboPac PA1 column (Dionex). The eluent was potassium hydroxide, at a flow rate of 1 mL/min. The following concentration gradient was used: 2 mM for 39 minutes, increasing to 10 mM for 2 minutes, 100 mM for 8 minutes and 100 mM for 3 minutes. The temperature was set to 25°C. The injection volume was 25 μL. External standards were used for polysaccharide identification. Fucose was used as an internal standard for polysaccharide quantification.

2.4.4. Anion and organic acid analysis by High Pressure Ion Chromatography (HPIC)

Chromatographic analysis was performed using a Dionexm incorporating an AS 11-HC (4mm) anion-exchange column and an AG11- HC precolumn. An amount of 25μL of each sample was injected into the loop of the chromatograph. The flow rate was 0.5 mL. min⁻¹ with a gradient of two mobile phases: Phase A was ultra-pure water and phase B was a solution at 2mM KOH.

2.4.5. Fourier transform infrared spectroscopy for Ulvan fractions

Spectra of ulvan were acquired using a spectrophotometer coupled with an ATR accessory (Spectrum100, Perkin-Elmer, USA). Each spectrum is the averaged values of 16 scans in transmittance mode from 4000 cm⁻¹ to 600 cm⁻¹ at are solution of 4 cm⁻¹.

The bands at 1633 and 1410 cm⁻¹ are assigned to asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxyl groups (-COO) of iduronic and glucuronic acids, the bands at 1233 and 849 cm⁻¹ correspond to

sulfate groups of ulvan (S=O). The high vibration bands at 1066 and 787 cm^{-1} are typical of the elongation of the C-O-C moieties of residues rhamnose, glucuronic, and iduronic acid forming the ulvans.

2.5. In vitro antifungal activity

2.5.1. Preparation of pathogen inoculum

Protocol was adapted from Nicosia et al. (2016) [28]. Fungal isolates of *Penicillium digitatum* were obtained from infected oranges and then cultivated on Malt Extract Agar (MEA, Sigma–Aldrich) in order to obtain single conidia colonies. For inoculum growth, cultures were kept at 22 °C for 7–10 days. Obtained spores were then collected using a sterile spatula, diluted in sterile distilled water, and then vortexed for 1 min to ensure uniform mixing. Spore concentration was fixed to 10^8 C.mL^{-1} using a densitometer (Biosan DEN-1B, McFarland densitometer). The obtained stock solution (10^8 C mL^{-1}) was then diluted to two solutions; S1= 10^6 C mL^{-1} was used for the study of extract effects on spore germination in liquid medium and on germ tube elongation, and S2= $2 \times 10^3 \text{ C mL}^{-1}$ was used to study the extract effects on fungus viability in solid medium.

2.5.2 Effects of of SLEs on spore germination and germ tube elongation

The solution S1 ($12.5 \mu\text{L}$ at 10^6 C mL^{-1}) were transferred to Eppendorf tubes to which $25 \mu\text{L}$ of SLEs. Then $12.5 \mu\text{L}$ of potato dextrose broth (PDB, Sigma–Aldrich) were added. Sterile ultrapure water (Water), organic solvent (Acetone, ethanol, ethyl acetate) and Nystatin were used as negative and positive controls. The tubes were then mixed and incubated for 20 hours at 22 °C followed by a vortex in order their homogenization. Afterward, $2 \mu\text{L}$ of spore suspension were transferred to microscope slides, mixed with $2 \mu\text{L}$ of Lactophenol blue than observed at a magnification of 40 for spore germination and tube elongation. For each slide, three observations were randomly done.

2.5.3. Effects of of SLEs on fungus viability

In order to evaluate the SLEs' effects on pathogen viability, 0.5 mL of solution S2 ($2 \times 10^3 \text{ C mL}^{-1}$) was transferred to Eppendorf tubes containing 0.5 mL of SLEs. Sterile ultrapure water, organic solvent (acetone, ethanol, ethyl acetate) and Nystatin were respectively used as negative and positive controls. Tubes were gently mixed and then incubated for 20 hours at 22°C. Afterwards, the tubes were mixed and $100 \mu\text{L}$ of each mixture was spread on MEA culture medium containing ampicillin and streptomycin. Finally, cultures were incubated at 25 °C and the number of colony-forming units (CFU) was counted after 3–4 days.

The CFU percentage of each tested extract was then calculated by comparing it with water, used as negative control.

2.5.4. Effects of SLEs on the adhesion of spores to the epidermal orange cells.

Protocol was adapted from Kimura and Pearsall (1978) [29]. The orange cells were directly taken from a vigorous orange (the middle ripening stage) by scratching its outer peel. These cells were then washed in PBS (1 mL/tube), centrifuged at 2500 g for 10 min, and finally re-suspended in 1 mL PBS for counting. *Penicillium digitatum* spores were taken from an infected orange and cultivated on Malt medium for 4 days at room temperature. Spores were then suspended in PBS. Spores and oranges cells' concentrations were evaluated using a densitometer (Biosan DEN-1B, McFarland densitometer). Spores and oranges cells' solutions were diluted to obtain concentrations of 10^7 cells/mL and 10^5 cells/mL respectively; 1 mL of orange cells' suspension was brought into contact for 1 h with 1 mL of crude extracts solutions (50 mg. mL^{-1}). After 1 h of incubation, 1 mL of *Penicillium* spores were added to the various mixtures and the whole mixture was stirred for 2 h at room temperature. After 2 h of incubation, the preparation was washed 3 times in

PBS; for a clean wash, 0.5 mL of PBS solution was added each time and the mixture was centrifuged at 2500 g for 10 minutes. The aim of these centrifugations is to eliminate the remaining free spores. The cells being in suspension, the test reading was carried out by the examination of fresh pellet reconstituted in 0.1 mL PBS. The adhesion index is defined as the number of *Penicillium digitatum* spores fixed per orange cell. An index greater than 25 is the indicator of a strong adhesion, whereas, for an index of less than 10, the adhesion is low (Linás 1986). The epidermal cells of ten orange were examined in triplicate for each extract and the averages of adherent cells were calculated.

2.5.5. Disk diffusion test for SLEs, ulvans and chlorophylls.

The determination of the antifungal properties of the extracts of *Penicillium digitatum* was carried out by a Disk diffusion test on Malt Extract agar, previously inoculated by flooding with *P. digitatum*. The microorganisms were grown on Malt Extract agar (Sigma Aldrich) plates at 24 °C for 48 hours prior to seeding into Malt Extract agar. One or several colonies of a similar morphology of each *P. digitatum* were transferred into the sterile distilled water and adjusted to the 0.5 McFarland turbidity standards (10^7 C mL⁻¹ suspension). Inoculates of the *P. digitatum* were seeded on Malt Extract agar. Each sterile disc was impregnated with 25 µL SLEs obtained according to protocol 4.2 or 25 µL ulvan fractions (500 mg in 10 mL distilled water) or 25 µL chlorophyll fractions (500 mg in 10 mL acetone). The sterile filter discs, 6.4 mm in diameter, were placed on inoculated agar medium and incubated at 24 °C for 48 hours. Nystatin (100 U/disc) was used as a positive antifungal control. The results were determined from the presence or absence of growth and the size of the inhibition zone. The diameter (mm) of the growth inhibition halos caused by the different extracts was measured. All the assays were carried out in triplicate.

2.6. Microscopic observation

Observations at high magnifications (×1000) were performed. A small quantity of cell suspension was placed on a specific plate (Nikon SMZ 1500). The images were captured under a constant exposure and illumination by a Nikon eclipse E600 camera.

2.7. Statistical analysis

All the data were subjected to variance analysis using the GLM procedure of SAS (SAS Institute, 1987, Cary, NC, USA). The mean pairwise comparisons were based on a Duncan test at 0.5% probability level.

3. Results

3.1. Extraction Yield

3.1.1. Extraction yield of SLEs

Four solvents were selected to test the effect of solvents with variable polarities, on the extract compositions and properties.

Extraction yields for *Ulva lactuca* from different geographic origins are presented in Table 1 and were calculated according to the formula below.

$$\% \text{ extraction yield} = 100 \times \frac{\text{Final Weight of dried extract}}{\text{Initial weight of dried material}}$$

Extraction yields are expressed in % w/w dry weight (d.w).

As expected, extraction yields depend on the solvent (hydrophilic and protic degree), as the solvent has various affinities with the chemical substances to be extracted (Table 1).

The hydrophilic fraction was similar in *Ulva lactuca* Food and Feed grades (30.7%) and lesser than for Lebanese *Ulva Lactuca* (44%).

Ulva lactuca powder for Food was about as rich in hydrophilic molecules as it was in lipophilic molecules (30% extraction yields). For *Ulva lactuca* powder (Feed), the hydrophilic fractions (30 %) was more abundant than the acetonic fractions (21–25%). The lipophilic fraction extracted with ethyl acetate was the most important for *Ulva lactuca* Food grade, sample which is probably richer in lipids.

Table 1: Yield of aqueous and organic extractions of *Ulva lactuca*

Type of extraction	Solvent	Macroalgae		
		<i>Lebanese</i>	<i>Chinese Ulva lactuca</i>	
		<i>Ulva lactuca</i>	Food powder	Feed powder
Aqueous Extraction	Water	20.6 ± 0.1 ^a	30.7 ± 0.0 ^a	30.7 ± 0.0 ^a
Organic Extraction	Ethanol	5.7 ± 0.1 ^c	10.6 ± 0.3 ^b	25.6 ± 0.2 ^b
	Acetone	25.0 ± 0.1 ^b	33.1 ± 0.9 ^a	21.2 ± 1.2 ^b
	Ethyl acetate	6.5 ± 0.2 ^c	13.2 ± 1.2 ^b	5.8 ± 0.1 ^c
Least significant difference (LSD)		12 %	7 %	4.90 %
Values with the same superscript letters have non-significant difference				

3.1.2. Extraction yield of ulvans

The amount of ulvan obtained from 20 g of Lebanese *Ulva lactuca* was 3.7 g corresponding to 18.5% yield. The two Chinese algae showed lower yield in ulvan (6-9%), indicating that other abundant hydrophilic molecules are present in their SAE (Table 2).

Table 2: Yield of Ulvan extracted from *Ulva lactuca* (% dried seaweed).

Lebanese <i>Ulva lactuca</i>	18.5 % ± 1.2^a
Chinese <i>Ulva lactuca</i> (Food Powder)	6.3% ± 0.1 ^b
Chinese <i>Ulva lactuca</i> (Feed Powder)	9.8% ± 0.4 ^c

3.2. Characterization of SAE and SOE

3.2.1. Pigment composition.

The results of pigments separated by TLC and column chromatography showed that *Ulva lactuca* extracts contain two important pigments, which were confirmed to their absorption maxima. The spectrum also showed absorption of two different compounds, one at 425 nm and 660 nm and the other at 428 nm and 645 nm which was correlated with pigments of chlorophyll a and b. Pigments in acetonic extracts of *Ulva lactuca* was determined by HPLC-UV. *Ulva lactuca* powder for Food was richer in total contents in chlorophyll and in pigments (Figure 3). *Ulva lactuca* (Food) showed the highest amounts of chlorophyll a (1.1 mg.g⁻¹) and chlorophyll b (0.7 mg.g⁻¹), which is in agreement with the extraction yield in acetone. *Ulva lactuca* powder for Feed and Lebanese *Ulva lactuca* have similar contents in chlorophyll a and b, with about 0.51 mg.g⁻¹ of each.

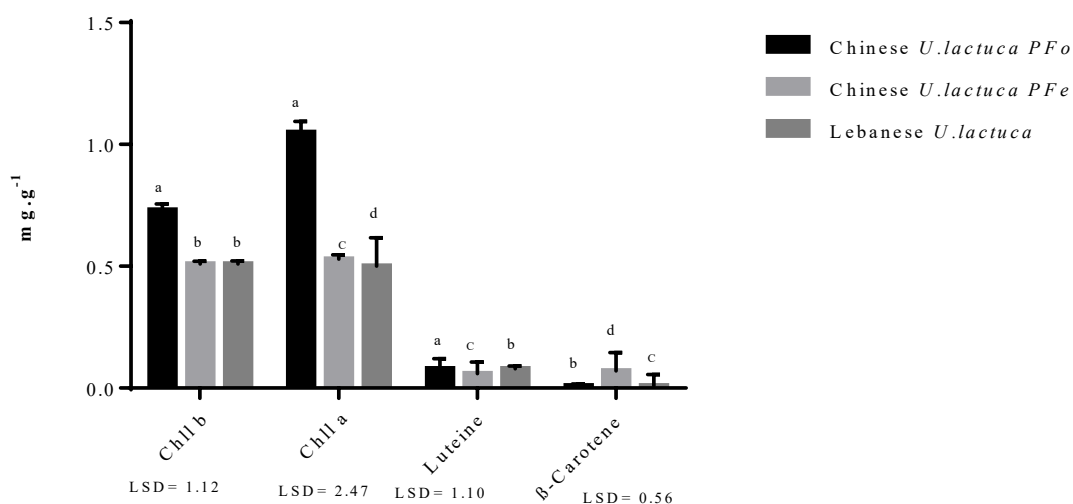


Figure 3: Pigment contents of the studied seaweeds *Ulva lactuca* (PFo: food powder, PFe: feed powder). Means in each compound with different letters (a-b-c-d) are significantly different (Duncan test at 0.5% probability level).

3.2.3. Polysaccharide analysis

The results shown in Table 3 indicate the polysaccharide compositions of SAE analyzed by HPLC. The compositions in sugar differ from one sample to another. The highest total contents of sugar are shown in Lebanese *Ulva lactuca* and in Chinese *Ulva lactuca* powder for Feed, respectively, with sucrose and fructose as the most abundant sugars (Table 3). *Ulva lactuca* powder for Food have the same total content of sugar at around 58 mg.L⁻¹, mainly composed of sucrose. Glucose was only found in *Ulva lactuca* powder for Feed. Rhamnose and xylose which are the main constituents of ulvan were not detected, so were few extracted by the protocol of aqueous extract.

Table 3: Polysaccharide composition of *Ulva lactuca* aqueous extracts (HPLC analysis).

Algae Source	Amount (mg. L ⁻¹)							Total
	Rhamnose	Galactose	Glucose	Sucrose	Xylose	Fructose	Mannitol	
Ch Ul. PFo	n.d.	1.05 ±0.06	1.35 ±0.04	52.32 ±0.04	n.d.	n.d.	3.95 ±0.04	58.68 ±0.04
Ch Ul. PFe	n.d.	2.31 ±0.03	25.23 ±0.01	n.d.	n.d.	37.32 ±0.03	n.d.	64.87 ±0.03
Leb Ul.	4.362 ±0.01	n.a.	5.98 ±0.02	n.d.	n.d.	66.61 ±0.04	n.a.	76.95 ±0.04

Values are expressed as the mean of three measurements ± SD.

3.2.4. Anions and organic acids composition of SAE

Organic acids and anions were detected in SAE (Figure 4). The results showed that the most abundant species are sulfates, which are partially connected to the presence of ulvan (sulfated polysaccharides) in the cell wall of green algae. On one hand, succinic acid contents of *Ulva lactuca* extracts are higher in Chinese *U. lactuca* PFe and PFo than Lebanese *U. lactuca* (Figure 4). On the other hand, a low content of maleic acid and phosphate compounds found in *Ulva lactuca* extracts.

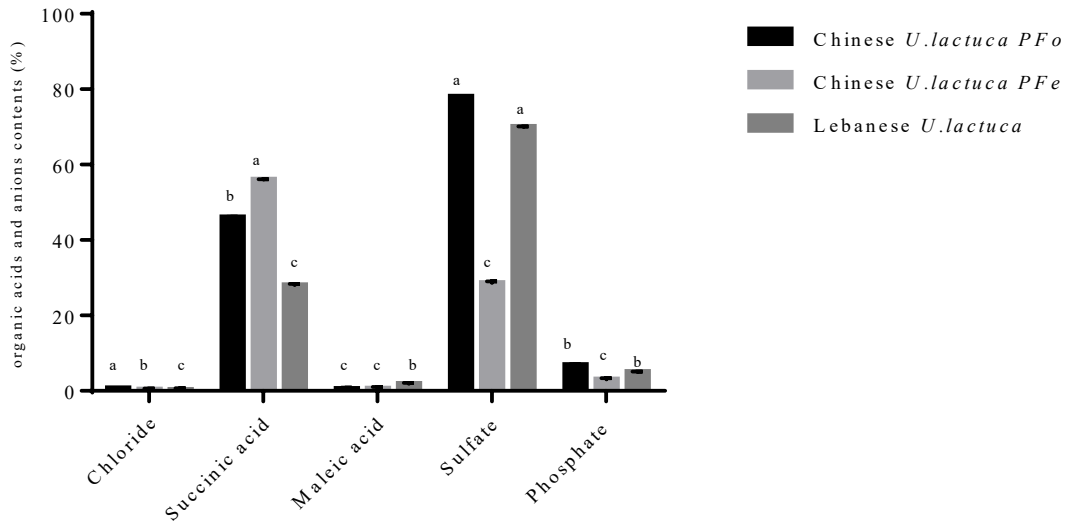


Figure 4: Organic acids and anions contents (%) of the aqueous extracts of *Ulva lactuca*. Means in each compound with different letters (a-b-c-d) are significantly different (Duncan test at 0.5% probability level).

3.2.5. Sulfate content in Ulvan

The sulfate groups in ulvan are supposed to play a positive role in the anti-fungal activity. The sulfate content in ulvan sample is the highest one for the Lebanese *U. lactuca* sample.

Table 4: Sulfate content (g/100g) in ulvan fractions obtained from Lebanese and Chinese *Ulva lactuca*.

Sulfate content (g/100g) in ulvan fractions		
Leb Ul.	Ch. Ul. PFo	Ch Ul. PFe
17.8 ±0,2	8.8 ±0.1	8.0 ±0.1

Values are expressed as the mean of three measurements ± SD.

3.3. In vitro antifungal activity of SLEs

3.3.1. Effects of SLEs on spore germination and on fungus viability

The results showed that the spores germinated in the negative control (water) after 20 h incubation, while there was no germination in the SLEs and the positive control (Nystatin). An inhibition of spore germination for all tested extracts ranged between 70 and 87%, compared with water (0%), acetone (20%), ethanol (25%), ethyl acetate (10%) as a negative control and Nystatin (100%) as a fungicidal standard (Figure 5 A).

After being incubated at 25 °C for 3–4 days, the number of colony-forming units (CFU) was recorded for all tested extracts.

The results in Figure 5 B show a strong antifungal activity against fungal multiplication ranged between 70% and 90%. While, the negative control showed a low percentage of inhibition of spore multiplication (water 0%, acetone 23%, ethanol 31% and ethyl acetate 17%). The use of these extracts on MEA seems to inhibit the development of the fungal pathogens. However, even if the tested aqueous extracts (SAE) showed some CFU, none of them showed a germination of fungal conidia and mycelium formation. In fact, all SLEs tested showed an ability to inhibit the germination of fungal spores after 4 days of incubation; development was then limited to multiplication.

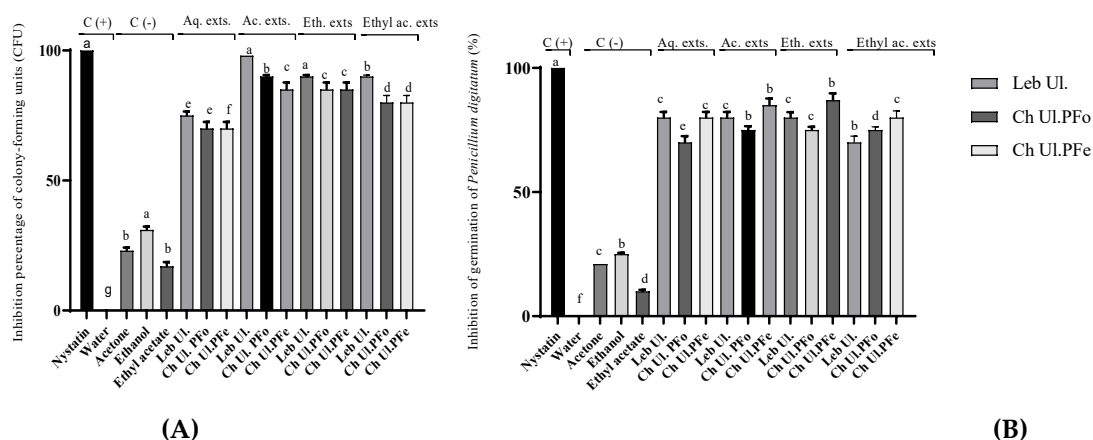


Figure 5: Inhibition efficacy of spore germination by Lebanese (Leb) and Chinese (Ch) *Ulva lactuca* (Ul.) Food powder (PFo), Feed powder (PFe), aqueous extracts (Aq.exts.), Acetonic extracts (Ac. exts.), Ethanolic extracts (Eth. Exts.) and ethyl acetate extracts (Ethyl ac. exts.) (A); Inhibition percentage of

colony-forming units (CFU) of fungal pathogens on MEA medium incubated for four days with SLEs (B). Means in each compound with different letters (a-b-c-d-e-f) are significantly different (Duncan test at 0.5% probability level).

3.3.2. Effects of SLEs on the adhesion of spores to the epidermal orange cells.

Figures 6 show the adhesion of *P. digitatum* spores to the epidermal cells of oranges in the presence of the various SLEs.

These results clearly show that all tested *Ulva lactuca* liquid extracts (SLEs) show an inhibitory activity in relation to the adhesion of the spores of *P. digitatum* on the epidermal cells of oranges. In fact, the index of adhesion for all tested extracts was lower than 10, which, according to Linas 1986, indicates a low spore adhesion.

However, a high adhesion was observed with water (AI=26), a moderate adhesion was showed with acetone (AI=7.2), ethanol (8.3) and ethyl acetate (9.5) used as a negative control and lower adhesion was observed with the antifungal Nystatin (AI=0) used a positive control.

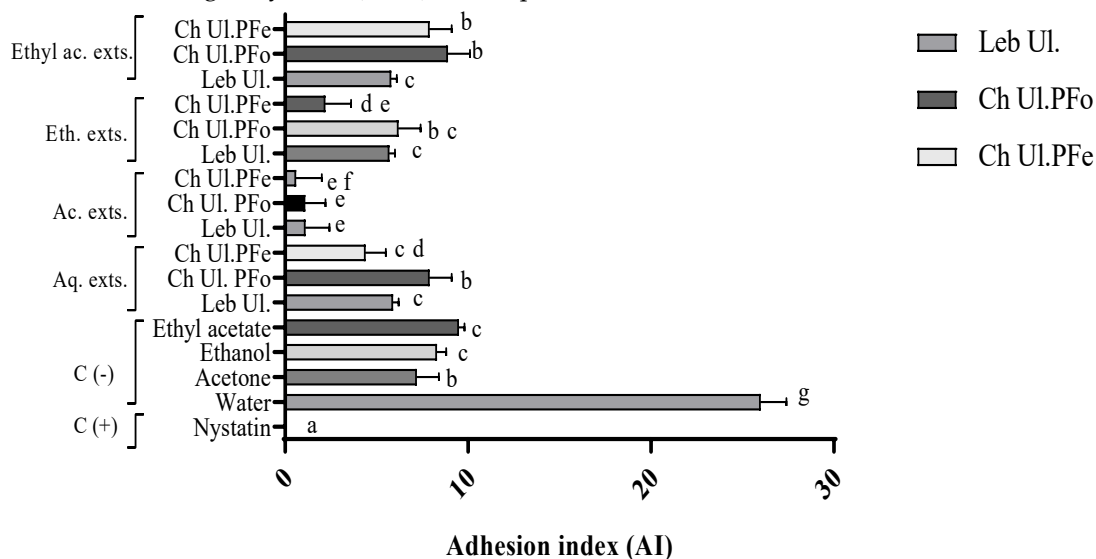


Figure 6: The adhesion index of *P. digitatum* to the orange's epidermal cells in the presence of the different tested SLEs. Photos of adhesion of *P. digitatum* to the orange's epidermal cells in the presence of the different tested SLEs. Means in each compound with different letters are significantly different (Least significant difference LSD= 1.8, Duncan test at 0.5% probability level).

3.4. Disk diffusion test

The antifungal activity of *Ulva lactuca* in different extracts was assayed against one fungal strain *Penicillium digitatum* by evaluating the inhibition zone diameter (mm). SLE were obtained with protocols for SAE and SOE. In these conditions, acetonic extracts were about 4 less time concentrated than chlorophyll fractions.

According to Table 5, extracts had inhibition zones ranged from 11 mm to 16 mm, above the limit value defined by Drouhet and Dupont (1976) for the positive control (Nystatin). The different SOE exhibited higher antifungal activities than their standard solvent, the highest gain being for SAE since

inhibition zone Diameter for water was nul. The ulvan fractions showed the highest inhibition zone diameter for three samples of *U. latuca*. Despite their lower concentrations in chlorophyll, the acetonic extracts showed higher inhibition zones than for the separated chlorophyll fractions. It means that the detected activity is due to other molecules present in acetonic extracts.

Table 5: Antifungal activities around the wells of different extracts of *Ulva lactuca* and the chlorophylls and ulvan fractions in relation to inhibition zone diameter (mm).

		Inhibition zone diameter (mm)						
		Extracts				Fractions		
		Aqueous	Acetonic	Ethanolic	Ethyl acetate	Chll a	Chll b	Ulvan
<i>Seaweeds</i>	Ch Ul. Pfo	12.5	14.1	13.1	12.5	11	10	19
	Ch Ul. PFe	11.1	13.8	14.2	12	15	10	17
	Leb Ul.	13	13.8	12.3	14	14	10	16
Control	Nystatin				13.5			
	Water				0			
	Acetone				10.2			
	Ethanol				9.3			
	Ethyl acetate				7.3			

4. Discussion

The acetonic and aqueous extracts of *Ulva lactuca* from Lebanon and China showed significant extraction yields ranged between 20 and 30 %. Cold extractions with a green organic solvent (ethyl acetate or ethanol) were carried out. The lipophilic fractions were obtained with yields between 6 and 13%.

The chemical compositions in functional molecules (pigments, organic acids, and polysaccharides) from Lebanese and Chinese *Ulva lactuca* extracts were determined. The samples of macroalgae showed extracts with different contents in polar and non-polar molecules. These differences in compositions are due to different environmental conditions, the season of harvesting, habitat, area of production, and geographical origin [33].

The acetonic extracts showed chlorophyll contents between 1.2 and 1.8 mg.g⁻¹ DM, chlorophyll. *Ulva lactuca* for Food powder was found to be the richest extract in chlorophyll. The chlorophyll a content of Lebanese and Chinese *Ulva lactuca* (ranged from 0.5 to 1.05 mg.g⁻¹) was higher than Chlorophyll b. In *U. Lactuca* from the Indian coast, 2.1 mg/g of chlorophyll were found [36].

The aqueous extracts of Lebanese *Ulva lactuca* showed the highest total contents of sugar (77 mg.L⁻¹) due partially to rhamnose content (Ulvan). The amount of ulvan recovered from Lebanese *Ulva lactuca* was particularly high. *Ulva lactuca* collected from Vietnam had 15% of ulvan [14], but the amount of ulvan extracted depends on the extraction conditions (pH, Temperature, enzymatic hydrolysis) [37]. The amount in sulfates (17.8%) in ulvan extracted from Lebanese *Ulva lactuca* indicates the high concentration in sulphated polysaccharides in this fraction.

Extraction yields by ethyl acetate led to values above the usual yields (1.3 – 2,6 %) obtained with petroleum ether or dichloromethane/methanol (AOAC method) applied for lipids extraction of *Ulva lactuca* [38].

The results of fungicidal effects of *U. lactuca* showed that the germination of conidia in PDB containing SLEs was significantly inhibited (70%–90%) after 20 hours of incubation compared to the control. The indexes of adhesion for the different extracts were lower than 10 which, according to Linas (1986), indicates a low spore adhesion. The inhibition of the adhesion of *Penicillium digitatum* spores to the epidermal cells of oranges by the various tested *Ulva lactuca* extracts can be considered as the first main step in the inhibition of the infectious cycle of this pathogen. In fact, the interactions of fungal spores with an external hard surface of the host are mandatory for spore germination and aspersorium formation, to lead to the infection of aerial parts of the hosts by the pathogens [39]. Moreover, the adherence of fungus on the host cells is known to be a prerequisite for the attachment, colonization, and infection of the cells by the pathogen [40]. Hence, when the SLEs inhibited the multiplication and the germination of *P. digitatum*, it means that the infectious life cycle will be arrested.

SLEs had higher inhibition zones compared to the positive control (Nystatin \geq 10 mm), highlighting thus an activity for each extract. The separated chlorophyll did not bring further activity compared to other acetonic extracts. The ulvan fractions showed the highest inhibition zones, confirming their expected activity. A few studies reported the potential effect of green algae extracts in the fungi inhibition process. For instance, antifungal activities were already observed for *Ulva rigida* extracts against *A. niger* and *C. albicans* at 12 mm [41]. Ethyl acetate extracts of *Ulva lactuca* obtained in Egypt exhibited a high antifungal activity against *Aspergillus flavipes* and *Candida albicans* [18]. The organic extracts (ethyl acetate, acetone) of green algae *C. humicola* showed an excellent effect of nearly 80% microbial growth inhibition of virulent strains of bacteria and fungi pathogenic to humans [20].

As antifungal activities for the different extracts were identified, we can assume that active compounds were present in all of them. Liposoluble pigments of marine algae have shown different beneficial biological activities, such as antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, antiobesity, antiangiogenic as well as neuroprotective activities [42]. Furthermore, the sulfated polysaccharides “ulvan” are reported to exhibit a wide range of physiological and biological activities, such as cytotoxicity [43]. It has been used as an alternative treatment for chemical fungicides [44]. In this study, the ulvan extracted from *Ulva lactuca* with 18.5% yield, and with high sulfate content (17%) showed for the first time an antifungal activity against *P. digitatum*. Another study has reported that the combination of ulvan and *Stenotrophomonas rhizophila* resulted in an efficient antifungal activity against *Fusarium proliferatum* in controlling fruit rot in muskmelon [45]. In fact, there are many natural pesticides used in agriculture based on sulfate and copper, used to fight against plant diseases, whether they are of cryptogamic origin (microscopic fungi or bacterial).

According to the *Ulva lactuca* origin, it is possible to select SAE rich in hydrophilic molecules present in Food or Feed powder *U. lactuca*. In SAE, organic acids, phenolic acids and polysaccharides, are the major bioactive compounds involved in anti-fungal properties. SOE fractions are mainly composed of fatty acids, glycolipids, liposoluble pigments, polyphenols and terpenoids, which can contribute to antimicrobial properties. Liposoluble pigments (chlorophyll and carotenoids) have confirmed their contribution. Palmitic acid, one of the main fatty acid from *Ulva lactuca* was also mentioned for its anti-fungal activity [19]. SOE could be then selected from Food powder. Anyway, lipids and polysaccharides may act as a protective matrix for bioactive compounds, thus preserving their efficiency over time.

Based on the potential inhibitory effect of the different fractions towards the fungi species *Penicillium digitatum*, this level of inhibition gives a promising indication for the development of an alternative to chemical fungicides, involving marine natural sources.

5. Conclusions

The conditions used to prepare extracts were mild and involved low-impact solvents, including biobased solvents. Despite their differences in composition, all the extracts (SAE or SOE) exhibited

antifungal activities linked to their contents in polar or low-polar molecules, among them, pigments, polysaccharides and organic acids. Sulfated Polysaccharides such as ulvan may have synergetic effects with other molecules. They can also act by protecting or as a vehicle of the activities of the different bioactive molecules. Thus, different types of formulations for a postharvest treatment could be prepared under the form of an aqueous dispersion of SAE, or an oil-in-water emulsion including SOE or SAE.

The results of the antifungal activity test are consistent. SOE or SAE act as inhibitors of the fungus germination, which limits the multiplication stage. Extracts can then inhibit the initiation of the infection process. These extracts need further *in vivo* tests in order to facilitate their industrial development. Moreover, additional studies aiming to elucidate the mechanisms for the inhibition of the germination of *P. digitatum* are in progress. This study showed that different extracts of *Ulva lactuca* could be promising to prepare natural alternative formulations for the postharvesting control of the green citrus fruit mold *Penicillium digitatum*.

Author Contributions: Conceptualization [A.C., P.D.C.]; Methodology [D.S., P.D.C., A.C.]; Formal Analyses and investigation [D.S., P.D.C.]; Statistical analyses [O.M.]; Writing - original draft preparation [D.S.; P.D.C., O.M.]; review and editing [P.D.C., O.M., A.C.].

Acknowledgments: This work was funded by the laboratory of applied biotechnology, Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, Doctoral School of Science and Technology, Lebanese University and the laboratory of Agro-industrial Chemistry (LCA) in Toulouse, France.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Karim, H.; Boubaker, H.; Askarne, L.; Cherifi, K.; Lakhtar, H.; Msanda, F.; Boudyach E.H.; Aoumar, A.A.B. Use of Cistus aqueous extracts as botanical fungicides in the control of Citrus sour rot. *Microb. Pathog.* **2017**, *104*, 263-267.
- [2] D'Aquino, S.; Fadda, A.; Barberis, A.; Palma, A.; Angioni, A.; Schirra, M. Combined effects of potassium sorbate, hot water and thiabendazole against green mould of citrus fruit and residue levels. *Food Chem.* **2013**, *141*(2), 858-864.
- [3] Moretto, C.; Cervantes, A.L.L.; Batista Filho, A.; Kupper, K.C. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits, *Sci Hort.* **2014**, *165*, 433-438.
- [4] Sharma, R.R.; Singh, D.; Singh, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control.* **2009**, *50*(3), 205-221.
- [5] Lai, K.; Chen, S.; Hu, M.; Hu, Q.; Geng, P.; Weng, Q.; Jia, J. Control of postharvest green mold of citrus fruit by application of endophytic *Paenibacillus polymyxa* strain SG-6. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**, *69*, pp.40-48.
- [6] Kinay, P.; Mansour, M.F.; Gabler, F.M.; Margosan, D.A.; Smilanick, J.L. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Prot.* **2007**, vol. 26, n° 4, p. 647-656.
- [7] Spadaro, D.; Droby, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists », *Trends in Food Sc. Techno.* **2016**, *47*, 39-49.
- [8] Briand, X.; Cluzet, S.; Dumas, B.; Esquerre-Tugaye, M. T.; Salamagne, S. Ulvans as activators of plant defense and resistance reactions against biotic or abiotic stresses. *U.S. Patent No. 7,820,176*. Washington, **2010**, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [9] Zhao, L.; Feng, C.; Wu, K.; Chen, W.; Chen, Y.; Hao, X.; Wu, Y. Advances and prospects in biogenic substances against plant virus: A review. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2017**, *135*, 15-26.

- [10] Holdt, S.L., Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 543-597.
- [11] Godos, J., Marventano, S., Mistretta, A., Galvano, F., Grosso, G. Dietary sources of polyphenols in the Mediterranean healthy Eating, Aging and Lifestyle (MEAL) study cohort. *International journal of food sciences and nutrition*, *68*(6), 750-756. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2017**, *68*, 750-756.
- [12] Lahaye, M., Robic, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromol.* **2007**, *8*, 1765-1774.
- [13] Abd-Ellatef, G.E.F., Ahmed, O.M., Abdel-Reheim, E.S., Abdel-Hamid, A.H.Z. *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. *Breast Cancer Dove Med. Press.* **2017**, *9*, 67-83.
- [14] Thanh, T.T.T., Quach, T.M.T., Nguyen, T.N., Luong, D.V., Bui, M.L., Van Tran, T.T. Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 695-702.
- [15] Adrien, A., Dufour, D., Baudouin, S., Maugard, T., Bridiau, N. Evaluation of the anticoagulant potential of polysaccharide-rich fractions extracted from macroalgae. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 2126-2136.
- [16] Yuan, Y., Xu, X., Jing, C., Zou, P., Zhang, C., Li, Y. Microwave assisted hydrothermal extraction of polysaccharides from *Ulva prolifera*: Functional properties and bioactivities. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *181*, 902-910.
- [17] Chiu, Y.H., Chan, Y.L., Li, T.L., Wu, C.J. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by the sulfated polysaccharide extracts from *Ulva lactuca*. *Mar. Biotechnol.* **2012**, *N. Y. N*, vol. *14*, n° *4*, p. 468-478.
- [18] Shobier, A.H., Ghani, S.A.A., Barakat, K.M. GC/MS spectroscopic approach and antifungal potential of bioactive extracts produced by marine macroalgae. *Egypt. J. Aquat. Res.* **2016**, *3*, 289-299.
- [19] Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T. Biological activities of two macroalgae from Adriatic coast of Montenegro. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 390-397.
- [20] Bhagavathy, S., Sumathi, P., Bell, I. J. S. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2011**, *1*, S1-S7.
- [21] Chbani, A., Mawlawi, H., Zaouk, L. Evaluation of brown seaweed (*Padina pavonica*) as biostimulant of plant growth and development. *Afr. J. Agric. Res.* **2013**, *8*, 1155-1165.
- [22] Chbani, A., Mawlawi, H. Fabrication d'un produit biocide à partir d'une algue verte contre *Penicillium digitatum*, champignon responsable des moisissures des Agrumes. Patent : Brevet d'invention, **2014** No. 10469.
- [23] Jiménez, E., Dorta, F., Medina, C., Ramírez, A., Ramírez, I., Peña-Cortés, H. Anti-phytopathogenic activities of macro-algae extracts. *Mar. Drugs.* **2011**, *9*, 739-756.
- [24] Chandini, S.K., Ganesan, P., Bhaskar, N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chem.* **2008**, *107*, 707-713.
- [25] Bilan, M.I., Grachev, A.A., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., Usov, A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 238-245.
- [26] Mao, W., Zang, X., Li, Y., Zhang, H. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *J. Appl. Phycol.* **2006**, vol. *18*, n° *1*, p. 9-14.
- [27] Prat. R. *Expérimentation en biologie et physiologie végétale* », Herman Editeurs. **2007**, Paris.
- [28] Nicosia, M.G.L.D., Pangallo, S., Raphael, G., Romeo, F.V., Strano, M.C., Rapisarda, P., Schena, L. Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *114*, 54-61.
- [29] Kimura, L.H., Pearsall, N.N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* **1978**, *21*, 64-68.
- [30] Ibtissam, C., Hassane, R., Jose, M., Francisco, D.S.J., Antonio, G.V.J., Hassan, B., Mohamed, K. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr. J. Biotech.* **2009**, *8*, 1258-1262.
- [31] Santos, S.A., Vilela, C., Freire, C.S., Abreu, M.H., Rocha, S.M., Silvestre, A.J. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food chem.* **2015**, *183*, 122-128.
- [32] Cho, M., Kang, I. J., Won, M. H., Lee, H. S., You, S. The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent-partitioned fractions from various green seaweeds. *J. Med. Food.* **2010**, *13*, 1232-1239.
- [33] Marinho-Soriano, E., Fonseca, P.C., Carneiro, M.A.A., Moreira, W.S.C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 2402-2406.

- [34] Turan, F., Ozgun, S., Sayin, S., Ozyilmaz, G. Biochemical composition of some red and green seaweeds from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Nature*. **2015**, *21*, 1.
- [35] Ismail, M. M., Gheda, S. F., Pereira, L. Variation in bioactive compounds in some seaweeds from Abo Qir bay, Alexandria, Egypt. *Rend Lincei-sci*. **2016**, *27*, 269-279.
- [36] Chakraborty, S., Santra, S.C. Biochemical composition of eight benthic algae collected from Sunderban. *Ind. J. Marine Sci*. **2008**, *373*, 329-332.
- [37] Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., Attia, H. Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast », *Food Hydrocoll*. **2014**, *40*, 53-63.
- [38] Mæhre, H. K., Malde, M. K., Eilertsen, K. E., & Elvevoll, E. O. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *J. Sci. Food Agric*. **2014**, *94*(15), 3281-3290.
- [39] Xiao, L., Herd, R. P. Epidemiology of equine Cryptosporidium and Giardia infections. . *Equine Vet. J*. **1994**, *26*, 9-13.
- [40] Sebastian, A.P., Keerthi, T.R. Adhesion and cell surface properties of wild species of spore formers against enteric pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Med*. **2013**, *6*, 110-114.
- [41] Ertürk, Ö., Taş, B. Antibacterial and antifungal effects of some marine algae. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. **2011**, *17*, S121-S124.
- [42] Pangestuti, R., Kim, S.K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J. Funct. Foods*. **2011**, *4*, 255-266.
- [43] Hussein, U.K., Mahmoud, H.M., Farrag, A.G., Bishayee, A. Chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in rats by sulfated polysaccharides and aqueous extract of *Ulva lactuca*. *Integr. Cancer Ther*. **2015**, *14*, 525-545.
- [44] Siah, A., Magnin-Robert, M., Randoux, B., Choma, C., Rivière, C., Halama, P., Reignault, P. Natural agents inducing plant resistance against pests and diseases. in *Natural Antimicrobial Agents. Sustainable Development and Biodiversity*, Mérillon JM., Riviere C., Eds.; Springer, Basel, Switzerland; **2018**, p. 121-159.
- [45] Rivas-Garcia, T., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Chiquito-Contreras, R., Rincon-Enriquez, G., Hernandez-Montiel, L. Effect of Ulvan on the Biocontrol Activity of *Debaryomyces hansenii* and *Stenotrophomonas rhizophila* against Fruit Rot of *Cucumis melo* L. *Agronomy*. **2018**, *8*, 12, 273.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article II. Identification du mécanisme de défense contre *Penicillium digitatum* à l'origine de la moisissure verte sur les agrumes.

Cette partie a pour objectif d'étudier la capacité des extraits d'algues vertes *Ulva lactuca* à induire la production des enzymes de défense dans les cellules des agrumes pour lutter contre *P. digitatum*.

Lors de l'étude précédente, nous avons mis en évidence l'activité antifongique des extraits d'*Ulva lactuca* par des tests *in vitro*. Pour cela, nous avons réalisé des tests *in vivo* ainsi des méthodes simples pour mesurer la quantité des protéines ainsi que l'activité enzymatique (β -1,3 glucanase et peroxydase) des cellules d'oranges. Le traitement de oranges est réalisé par des extraits aqueux, des extraits éthanoliques d'*Ulva lactuca* et par une fraction acétonique riche en chlorophylles. Le suivi est effectué à intervalles réguliers (0h, 12h, 24 h, 48h et 72h). Des enzymes tels que les glucanases contribuent au mécanisme d'action basé sur la dégradation de la paroi cellulaire fongique composée principalement de glucane, ce qui retarde la germination des spores et l'élongation du tube germinatif.

Les peroxydases qui jouent un rôle clé, lors de la synthèse de la lignine, agissent comme un renfort de paroi cellulaire des agrumes en améliorant la résistance contre de multiples pathogènes. De plus, les peroxydases augmentent la capacité des agrumes à faire face à l'infection des *Penicillium* par l'activité antioxydante.

Les essais *in vivo* montrent que les extraits aqueux *Ulva lactuca* réduisent l'incidence de la moisissure verte des oranges de 75 à 80% par rapport au témoin négatif traité à l'eau après 45 jours de stockage à la température ambiante. De même, les résultats de l'essai industriel réalisé au centre Safadi pour l'emballage et l'exportation des fruits à Halba, Akkar (Liban) a montré un pourcentage de 90,5% d'inhibition de *P. digitatum* après 4 semaines de stockage pour les oranges traitées par les extraits aqueux *Ulva lactuca*. Les oranges traitées par la cire de Decco (contrôle positif) généralement utilisée lors de la procédure d'exportation a donné un pourcentage de 77,7 % d'inhibition à la fin de ce test.

Les extraits d'*Ulva lactuca* sont en mesure de contrôler les infections causés par *P. digitatum* lorsqu'ils sont appliqués sur des zones proches de l'inoculation du pathogène, ce qui favorise l'induction de la résistance de l'hôte comme mode d'action possible.

La modification de la concentration en protéines au niveau des tissus d'oranges traités par les extraits a été corrélée avec l'induction de la production des enzymes de défense β -1,3 glucanase et de peroxydase dans les oranges traitées.

Tous les extraits et en particulier, l'extrait éthanolique et la chlorophylle a d'*U. lactuca* ont provoqué une augmentation transitoire des activités enzymatiques de β -1,3 glucanase et de peroxydase dans les tissus d'oranges à partir de 24 h et a atteint les niveaux maximaux à 48 et 72 h après traitement.

En conclusion, les résultats obtenus ont montré que l'inhibition directe de *P. digitatum* et l'induction de la résistance des oranges sont les deux processus impliqués dans les modes d'action d'*Ulva lactuca* pour la lutte biologique contre la pourriture des agrumes.

Les différentes étapes de cette étude sont présentées sous la forme d'un article soumis au *Journal Postharvest Biology and Technology*.

***Ulva lactuca* induces defense responses against *Penicillium digitatum*, the postharvest green mold on citrus fruit.**

Douaa Salim^{1,2}, Rayane Chahal¹, Josephine Al Alam¹, Maya Rima¹, Othmane Merah^{2,3}, Pascale de Caro³, Asma Chbani^{1,2}.

¹ Laboratory of applied biotechnology, Azm Center for Research in Biotechnology and its Applications, Lebanese University, Tripoli, Lebanon.

² Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, Toulouse INP, France. e-mails : pascale.decaro@toulouse-inp.fr, douaa.salim@ensiacet.fr, othmane.merah@ensiacet.fr

³ Université Paul Sabatier, IUT A, Département Génie Biologique, 24 rue d'Embaquès 32000 Auch, France.

⁴ Faculty of Public Health III, Lebanese University, Tripoli, Lebanon. e-mails: achbani@ul.edu.lb

* **Correspondence:** douaa.salim@ensiacet.fr, Tel: +33534323505

Abstract

Penicillium digitatum caused annually severe damages in postharvest and stored fruits. Limiting chemical forces to seek acceptable solutions environmentally and sanitarilly. The aim of this study was to investigate the ability of the green macroalgae *Ulva lactuca* aqueous, *ethanolic extracts and their chlorophyll a and b* to activate defense mechanisms in citrus fruit against postharvest green mould caused by *P. digitatum*. However, little is known about its mode of action. The *in vivo* test by pulverizing the oranges with *Ulva lactuca* aqueous extracts was performed and lasted for 45 days. In particular, once the antifungal activity of the seaweed liquid extracts (SLEs) in the absence of direct contact with the pathogen was confirmed, changes in the protein concentration, enzyme activity of β -1, 3-glucanase, and peroxidase in treated oranges were analyzed. The results of the *in vivo* test indicated that the aqueous extracts (SAE) reduced the incidence of the green mold of oranges by 75-80 %, compared to the water-treated control after 45 days of the storage period. The SLEs were able to control *P. digitatum* infections when applied in wounds nearby those inoculated with the pathogen, supporting the induction of host resistance as a possible mode of action. Overall, the SLEs and especially the chlorophyll **a** of *Ulva lactuca* caused a transient increase in β -1,3-glucanase and peroxidase activities in orange tissues starting 24 h and reaching maximum levels 48 and 72 h after treatment. The obtained results showed that both the direct inhibition of *P. digitatum* and the induction of fruit resistance should be considered as important aspects of the

multiple modes of action of *Ulva lactuca* in controlling postharvest citrus rots and may be considered as the basis of its biocontrol activity.

Keywords: *Ulva lactuca*, β -1, 3-glucanase, peroxidase activity, *Penicillium digitatum*, Citrus fruit, biocontrol.

1. Introduction

Citrus is one of the most important crops in many countries, widely cultivated in the Mediterranean area. These fruit are the world's major fruit crop grown commercially in more than 100 countries across six continents (Terol et al. 2007). They contain several phytochemicals and nutraceuticals including vitamin C with disease-preventing and life-sustaining functions (Dillard and German 2000).

However, citrus fruit are subjects to many diseases altering their beneficial properties. In fact, these diseases are majorly exerting their attack during the post-harvest phase of fruit. Among these latest figures the green mold, caused by *Penicillium digitatum* and which is considered as of the most devastating pathogen, causing up to 90% of product losses (Macarisin et al. 2007). *P. digitatum* requires wounds to enter the fruit through the flavedo. It infects the fruit in the orchard, the packinghouse, and during storage, distribution, and marketing, by disseminating its spores in the air (Palou et al. 2008).

Traditionally, controlling this mold is performed using synthetic fungicides such as Imazalil, thiabendazole, pyrimethanil and fludioxonil used to minimize postharvest decay (Kanetis et al. 2007). However, the intensive use of these chemicals led to several disorders in the postharvest control such as the reduced number of authorized active compounds, and the increased resistance of some postharvest fungal pathogens against the few authorized fungicides. Moreover, the growing consumer demand for safer fruit and higher quality of these commodities, have aroused important issues relating to environmental protection and human health, prompting to search for safer and eco-friendly control means (Casals et al. 2010; Mari et al. 2012). Moreover, several concerns associated with their use, such as pathogen resistance, costs of registration and re-registration of active ingredients, have encouraged the search for new and safer alternatives (Kharchoufi et al. 2018; Madanipour et al. 2019; Li et al. 2019; Carmona-Hernandez et al. 2019). Therefore, increasing the fruit's natural defense capabilities through induction of resistance

is one of the alternative strategies being investigated as a mean to reduce the use of chemical fungicides during postharvest handling and storage of fruit and vegetables. In fully mature citrus fruit, increased resistance against *P. digitatum* infection can be achieved by application of physical (Singh and Sharma 2018), a chemical (Zhang et al. 2018) or antagonistic microorganism treatments (Carmona-Hernandez et al. 2019).

In this context, an increased attention of the seaweed use for avoiding postharvest losses of fruit has been given from the 2000s. Marine algae are a source of numerous natural bioactive molecules which can be attributed in the protection process against agricultural pathogens (Xu and Leskovar 2015; Acurio et al. 2018; Martins et al. 2018; Sujatha et al. 2019). The activity of several macroalgae has been comprehensively evaluated (Mayer et al. 2009; Aruna et al. 2010; Dussault et al. 2016; Jesus et al. 2019; Sujatha et al. 2019). Seaweeds have shown antifungal properties against plant pathogenic fungi (Khanzada et al. 2007; Jayaraj et al. 2008; Aruna et al. 2010; Ambika and Sujatha 2015; Soliman et al. 2018).

Green seaweed has received a great deal of attention as a promising alternative method to fungicides for controlling post-harvest diseases in citrus. Among the various types of macroalgae, green algae should be useful in terms of antifungal protection, as different antifungal molecules have been isolated from several types of green algae (Liu et al. 2013; Abouraïcha et al. 2015). Among the functional compounds identified, there are natural pigments; particularly chlorophyll, occupy an important place by presenting important biological activities on the medical level: anti-oxidant, anti-cancer, anti-inflammatory, and antimicrobial (Chandra et al. 2017). In fact, chlorophyll present in the organic extract of the green alga *Ulva linza* has been shown to prevent the rot of oranges by the fungus *Penicillium digitatum* (Chandra et al. 2017). Also, *Ulva lactuca* Linnaeus evaluated for antimicrobial activity, *Ulva lactuca* extracts showed a great antifungal activity against *Aspergillus Niger* and *Candida albicans* (Alang et al. 2009; Kosanić et al. 2015). The understanding the mechanisms underlying induced resistance would help to improve the development of this alternative strategy, the first step is the knowledge of the biochemical bases of induced resistance is very poor.

The overall objective of the present study was to determine the mode of action of green seaweed *Ulva lactuca* extracts and their purified chlorophyll in controlling green mold caused by *P. digitatum* on citrus fruit. More specifically, we investigated its effect on (i) *in vivo* fungal growth,

(ii) green mold on citrus fruit (iii) activity of the defense-related enzymes β -1,3-glucanase and peroxidase, and (iv) industrial assay with *Ulva lactuca* extracts treatment compared to the wax treatment.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ulva lactuca was freshly and manually collected from a coastal zone of the Mediterranean, El Mina (34 ° 26 'N - 35 ° 50' E) in Tripoli, Lebanon, on April 1st, 2017. The algae were cleaned with seawater to remove unwanted impurities, then cleaned three times with distilled water and dried at room temperature until the mass remained constant. The samples were then stored hermetically at room temperature. Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cv. Valencia late were harvested from a local orchard in Tripoli (Lebanon), selected for uniformity of size and absence of symptoms of any disorders, and immediately processed. Fruit were surface-sterilized with a 2% commercial bleach solution for 2 min, washed with tap water and air-dried at room temperature.

Milli-Q water (PURELAB classic) was used during all work. Acetone (60%), Ethanol (100%) were of analytical grade were purchased from VWR. Phosphate buffered saline (PBS), Potato dextrose agar (PDA), Nystatin Suspension, chlorophyll a standard, sodium acetate buffer solution, sodium potassium tartrate, Bovine Serum Albumin (BSA), Bradford Reagent, 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS), Laminarin, Guaiacol, Malt Extract agar were purchased from Sigma Aldrich and Decco wax purchased from Citrashine.

2.2. Extraction of seaweed liquid extracts (SLEs)

2.2.1. Seaweed Aqueous extracts (SAE)

SAE were prepared according to Jiménez et al. (2011). Five grams of dried algae was put in a 100 mL flask. 100 mL of boiling Milli-Q water was added. The medium was stirred magnetically for one hour at room temperature. The extract was then filtered twice through a double layer of sterile muslin cloth and then cooled to room temperature. After filtration, the extracts were stored at 4 ° C until analysis.

2.2.2. Seaweed Organic extracts (SOE)

Five grams of algal material were macerated in 100 mL of organic solvent at room temperature for a period of three days with a regular shaking (orbital shaker) (Chandini et al. 2008). After filtration, ethanol was evaporated under vacuum at 45° C to furnish a dry material. The extract was stored at 4 ° C until analysis.

2.2.3. Pigments extraction

Five grams of *Ulva lactuca* was homogenized in acetone (100 mL, 80%) and allowed to stand overnight in dark at 4 °C for complete extraction followed by centrifugation at 10 000 Xg for 5 min. The separation of Chlorophyll a and b *Ulva lactuca*, was released by the method of differential solubility of pigments in organic solvents (Prat.R., 2007).

2.3. In vivo laboratory protective test of SAE against *P. digitatum* infection

To examine whether the SAE have inhibitory effects against *P. digitatum*, oranges were treated with these extracts and then infected with *P. digitatum*. First, the oranges were dried and then deposited on plastic plates containing absorbent paper, which was soaked with sterile distilled water in order to provide a moisture content of 95-100%. Each orange was then pulverized with 4 mL of SAE extracts. Three oranges were used for each extract. The chemical fungicide; Nystatin was used as a positive control and distilled water as a negative control (Chbani et al. 2013). Two hours after the pulverization, oranges were infected with *P. digitatum* by spreading 10 µL of spore suspension (10^5 spores/mL suspension) on their surface. The spore suspension was prepared by scraping the surface of PDA in older cultures incubated for 6 days at room temperature using a sterile spatula. This suspension was put into a blender with a few drops of Tween 20 (used as a solubilizing agent for membrane proteins). Then, it was transferred to a spray device producing very fine droplets. Treated oranges were covered with a transparent film and stored at room temperature. 5 to 6 days after inoculation, the macroscopic aspects of the oranges were studied (Jiménez et al. 2011).

The *in vivo* test was applied by pulverizing the oranges with SAE and then after two hours they were infected by the *P. digitatum*. This test lasted for 45 days starting from April 12, 2017 to May

26, 2017. During this period, five sets of treated oranges were daily monitored and the number of rotten oranges has been recorded.

2.4. *In vivo* industrial essay

The *in vivo* test was conducted at the Safadi center for fruit packing and exporting in Halba, Akkar-Lebanon and lasted for 5 weeks starting from March 28, 2018 to May 2, 2018. Three sets of freshly harvested oranges of type “Valencia” were used in the test as follows: 180 oranges treated with aqueous extracted of *Ulva lactuca*, 180 oranges treated with Decco wax, is a fungicide with effective action on *Penicillium* in harvested citrus fruit, 180 oranges not treated at all. *Ulva lactuca* aqueous extracts are sprayed on oranges during their rotation on the conveyer belt allowing a full cover of the oranges. Then the oranges pass through an area of hot air to get dry and then reach their final destination in the spraying system, where they manually picked up and put into large boxes. Finally, oranges were packaged in the same way for their exportation, and they were stored in five small plastics boxes, same procedure were used for treatment with Decco wax and untreated oranges.

2.5. Testing of algal extracts as resistance inducers

Oranges were wounded once (5 mm depth × 3 mm wide) with a sterile nail-head along the equatorial axis. For each treatment, 100 µL of each of the algal extracts or their purified chlorophyll (Chlorophyll **a** and **b**) were applied into each wound. Oranges treated with sterile distilled water, ethanol, chlorophyll **a** standard and Nystatin (fungicide), were used as a control. Treated oranges were placed in a tray, which was then wrapped into a plastic bag. After 48 h of incubation at 20 °C in a high relative humidity (RH, 90–95%), another wound was made approximately 5 mm away from the previous one. This wound was air-dried and inoculated with 10 µL of a 10^4 conidia mL⁻¹ suspension of *P. digitatum*. Each treatment was done in 3 replicates made of 4 oranges each. Replicates were again wrapped in a plastic bag (90–95% RH) and maintained at 20 °C for two weeks. The incidence of decay (percentage of infected wounds, %) and disease severity (lesion diameter, mm) were recorded. The whole experiment was repeated twice.

2.6. Tissue sampling for extractions

Fruit were individually wounded with a sterile nail (3 mm wide × 5 mm deep) at eight points on the equatorial surface. Samples were designated as follows in table 1:

Table 4: Sampling Design.

Wounded/Treated fruit	Water
	Ethanol
	Nystatin
	Chlorophyll a standard
	<i>Ulva lactuca</i> aqueous extracts
	<i>Ulva lactuca</i> ethanolic extracts
	Chlorophyll a and b purified from algal extracts
Unwounded fruit	Untreated

In each wound, 30 µL of the above-mentioned treatments were applied. For each treatment fruit were randomized and arranged into 5 lots for tissue excision at different time intervals (0, 12, 24, 48, 72 h). Each lot was made up of 3 replicates of 4 fruit. The whole experiment was repeated twice. Fruit were arranged in plastic boxes, which were then individually wrapped into plastic bags (90–95% RH) and stored at 20 °C for 72 h. At the established time intervals, tissue cylinders (5 mm) from each lot were excised from the inoculation site. The excised tissues were mixed and ground to a fine powder using a commercial blender and stored at –80 °C until use for enzyme assays (Youssef et al. 2014).

2.7. Enzyme assays

From each sample and sampling time, 10 g of fine tissue powder were homogenized with 50 mmol sodium acetate buffer pH 5.6 (1:1, w/v), centrifuged (15 min at 10,000 × g and 4 °C) and the supernatant was then filtered through filter paper by a Buchner funnel. Proteins were precipitated in 60% acetone (v v⁻¹) at –20 °C and the resulting pellet, following centrifugation (30 min at 10,000 × g and 4 °C), was washed 3 times with 60% cold acetone. The pellets were dried, re-suspended in 2 mL of 50 mmol sodium acetate buffer (pH 5.6) and kept at –20 °C until use. The protein concentration was determined according to Bradford (1976) with the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories Ltd., USA).

2.8.1.β-1, 3-Glucanase activity

β-1,3-Glucanase activity was determined following the method of Abeles and Forrence (1970), by incubating 65 μL of protein extracts for 2 h at 37 °C in 65 μL of 4% (w/v) laminarin. The reaction was stopped by adding of 300 μL of 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) (prepared by dissolving 2.18g DNSA (MW=228.1g.mol⁻¹) in 80 mL of 0.5 M NaOH followed by heating and stirring at 70 °C. Then the addition of 30 g of sodium potassium tartrate (MW= 282.2 g.mol⁻¹) was following by cooling it to room temperature where it was brought to 100 mL with purified water. The sample was heating in boiling water for 10 min and then rapidly cooling it in ice. The absorbance of each sample was measured at 492 nm and activity values were reported as μmol glucose equivalents to μg⁻¹ of total protein min⁻¹.

2.8.2. Peroxidase activity

Peroxidase activity was determined using guaiacol as substrate (Hammerschmidt et al. 1982). The reaction mixture, consisting of 100 μL of crude extract and 100 μL of 50 mmol sodium acetate buffer pH 5.6 (10 mmol of guaiacol and 10 mmol H₂O₂), was incubated for 60 s at room temperature. The increase in absorbance at 470 nm was assayed by spectrophotometry (Beckman DU 640 Spectrophotometer, Corona, CA, USA) and the enzyme activity was expressed in U g⁻¹ protein s⁻¹.

Statistical analysis

Data were subjected to ANOVA (one-way analysis of variance and two-way analysis) using the statistical software package Statistics for Windows (GraphPad prism). Data from repeated experiments were combined since statistical analysis determined homogeneity of variances. The data were submitted to the analysis of variance (ANOVA) and means were compared using the one way or two ways ANOVA using a Dunnett's multiple comparisons test to determine the significance of the treatments. *In vivo* experiments were made using three repetitions. In trials with artificially inoculated fruits, each repetition consisted of 9 oranges fruit kept in separate plastic boxes. The enzyme activity was made using three measurements.

3. Results

3.1. *In vivo* protective test of SAE against *P. digitatum* infection

The percentages of non-infected oranges on every recording day for all orange sets are analyzed by Two-way ANOVA ordinary. The results are shown in figures 1, 2 and table 2. For oranges treated with *Ulva lactuca* aqueous extracts 100% of the treated correspondent oranges remained not infected for the first 2 weeks. This number decreased slightly during the period of study to reach 75% at the end of the test.

For untreated oranges sprayed only with water (negative control), on the 9th day after treatment, 1 out of 12 oranges was contaminated by *P. digitatum* (infection percentage 8%). The contaminated oranges raised continually and more markedly than those treated with seaweed to attain 33% of contaminated oranges at the end of the assay. However, as Nystatin was the reference fungicide used, none of the treated correspondent oranges was infected by *P. digitatum*. Thus, 100% of oranges remained healthy with normal external appearance during the 45 days of the test.

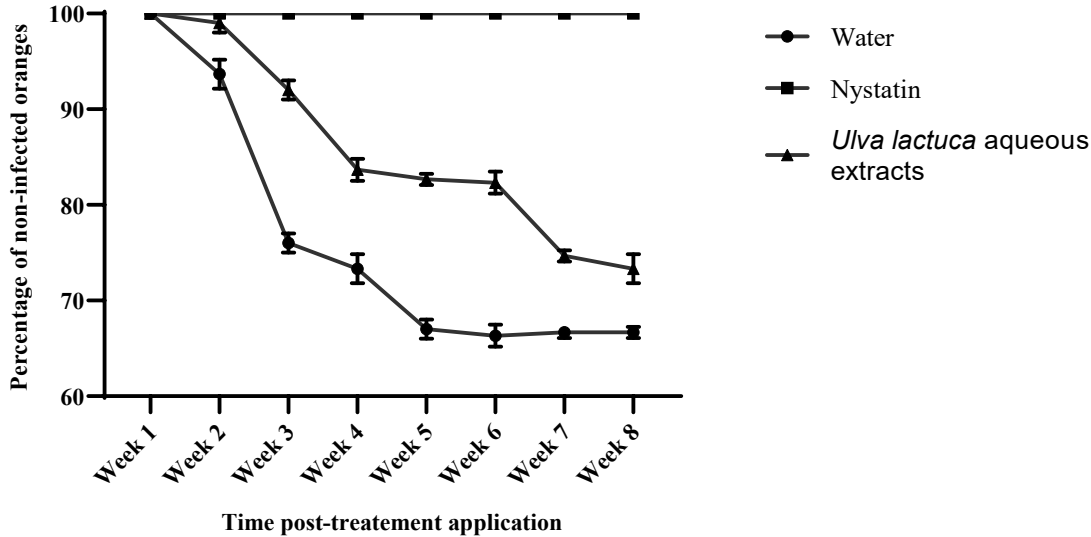


Figure 1: Percentage of non-infected oranges treated with water (control-), Nystatin (control+), Lebanese *Ulva lactuca* aqueous extracts. Values represent in the figure are mean \pm SD of three replicates. $p < 0,0001$ ****.

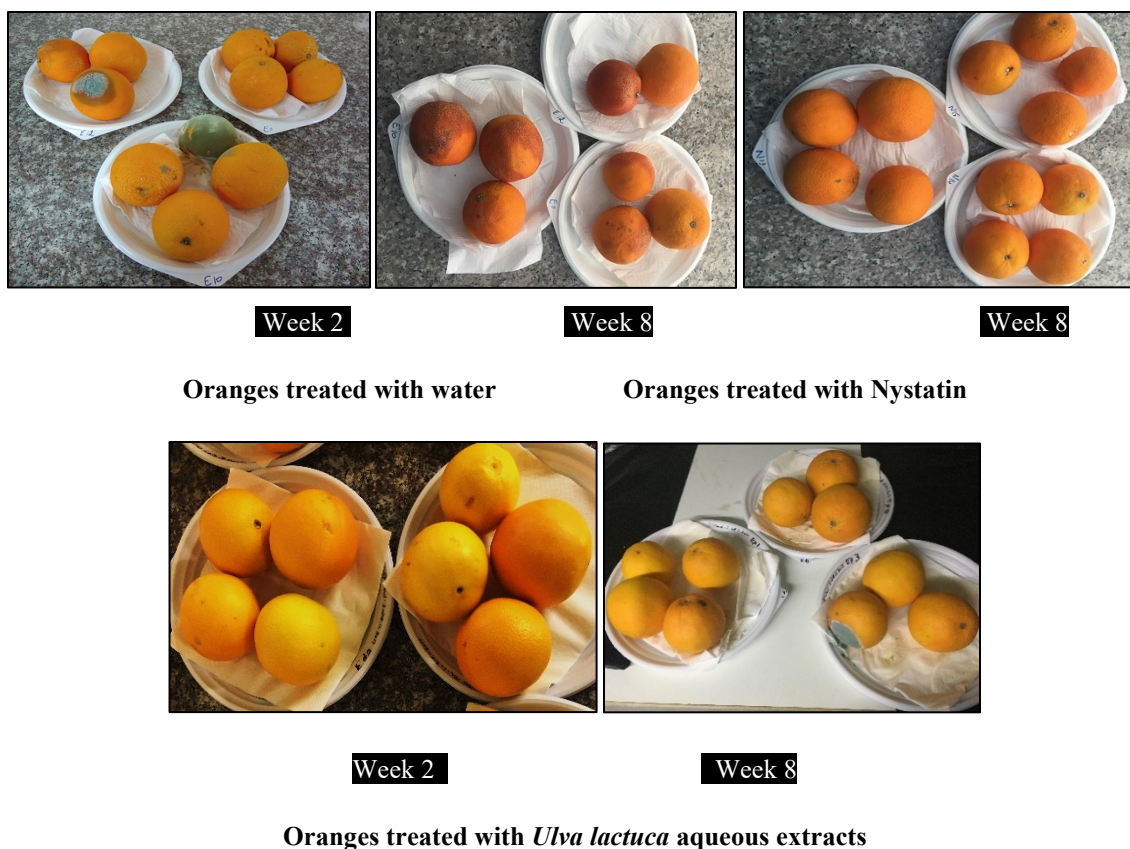


Figure 2: Oranges treated with water (control-), Nystatin (control+), Lebanese *Ulva lactuca* aqueous extracts after the 2nd, 4th and 8th week of treatment.

3.2. *in vivo* industrial essay

The results of the industrial essay at Safadi center for fruit packing and exporting in Halba, Akkar, Lebanon represented in figure 3 and 4. For untreated oranges (negative control), on the second week of the assessment day, one out of 180 oranges was contaminated by *P. digitatum* (infection percentage is 0.5 %). Then, on the end of the 4th monitoring week, ten more oranges were found rotten and were thus removed (total infection percentage became 6.2 %). From the end of the 4th week and until the end of the test, 10 more oranges out of the 169 oranges left in the boxes were contaminated by *P. digitatum*. Hence, 21 of 180 oranges were infected throughout the test leading to a final *P. digitatum* inhibition percentage of 88.3%. For oranges treated with Decco wax, none of the 180 monitored oranges were infected by *P. digitatum* for the first three monitoring weeks. However, at the end of the 4th monitoring week, 22 out of 180 oranges were contaminated by the fungi and were then removed from the boxes (infection percentage was about 12.3%). From the end of the 4th week and until the end of the test, 18 more oranges out of the 158 oranges left were

contaminated by *P. digitatum*. Hence, 40 of 180 oranges were infected throughout the test leading to a final *P. digitatum* inhibition percentage of 77.7 %. For oranges treated with *Ulva lactuca* aqueous extracts, none of the 180 monitored oranges were infected by *P. digitatum* for the first three monitoring weeks. However, at the end of the 4th monitoring week, 5 out of 180 oranges were contaminated by the fungi and were then removed from the boxes (infection percentage was about 2.8%). From the end of the 4th week and till the end of the test, 12 more oranges out of the 175 oranges left were contaminated by *P. digitatum*. Hence, only 17 of 180 oranges were infected throughout the test leading to a final *P. digitatum* inhibition percentage of 90.5 % after 5 weeks, which is the best among the three sets of oranges.

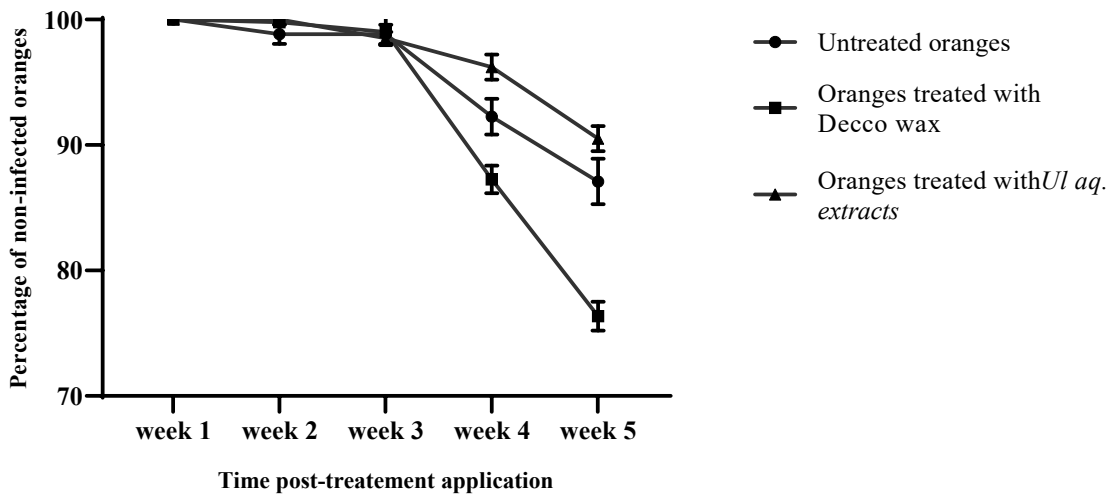


Figure 3: Percentage of non-infected oranges of untreated oranges and oranges treated with Decco wax (control+), Lebanese *Ulva lactuca* aqueous extracts. Values represent in the figure are mean \pm SD of three replicates. $p < 0,0001$ ****

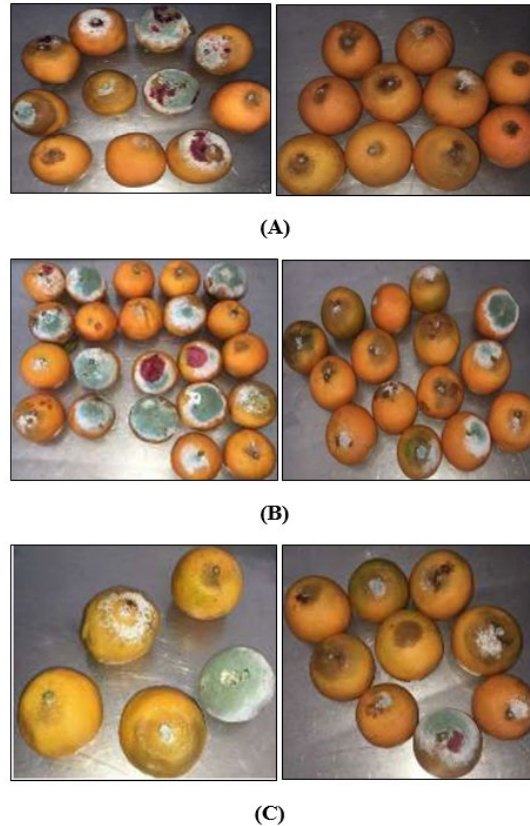


Figure 4: Infected oranges from: (A) Untreated oranges set, (B) oranges treated with wax set and (C) *Ulva lactuca* aqueous extracts.

3.3. Testing of extracts as resistance inducers

Green mold incidence and severity on oranges wound-treated with water, chlorophyll a standard and Nystatin as control. Also, on oranges wound-treated with aqueous, ethanolic extracts of *Ulva lactuca* and their purified chlorophyll a, b, after 48 h challenge inoculated with *P. digitatum* in a wound 5 mm apart from the previous one, are reported in figure 5. The results showed that the ethanolic extracts and the chlorophyll a of *Ulva lactuca* treatments had the lowest percentage of infected wounds (25-35%); showing that they were able to reduce significantly the disease incidence. However, the untreated orange, the aqueous extracts and the chlorophyll b of *Ulva lactuca* had 40-55% of infected wounds compared to the negative control water. Similarly, with regard to disease severity, a significant reduction of lesion diameters was recorded by the ethanolic extracts treatments (22-35mm), where the chlorophyll a from *Ulva lactuca* behaved the most efficiently (10-20 mm).

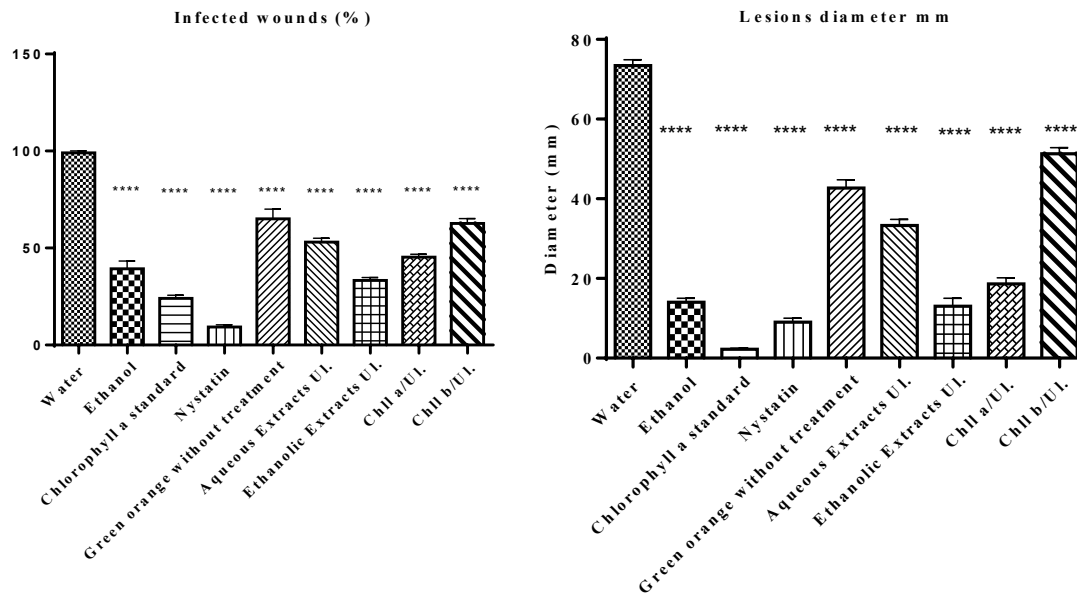


Figure 5: Disease incidence (percentage-infected wounds) and severity (lesion diameter, mm) caused by *Penicillium digitatum* on oranges treated by the different control and aqueous and ethanolic extracts of *Ulva lactuca* and their purified chlorophyll. Values represent in the figure are studied by ordinary one-way ANOVA, $p < 0,0001$ ****.

3.4. Proteins quantification

The protein concentration was determined according to Bradford (1976). The results showed that all studied tissues treated with all extracts had approximately the same concentration of protein at 0 h, 12 h and 24 h of incubation (Figure 6). This concentration was increased at 72 h particularly for the orange treated with the *Ulva lactuca* aqueous extracts ($337 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). However, the protein concentration of oranges tissues treated with chlorophyll a of *Ulva lactuca* was reaching a high concentration at 48 h. The untreated orange, as well as the orange treated with Nystatin, showed a decreasing of protein concentration at 48 h incubation.

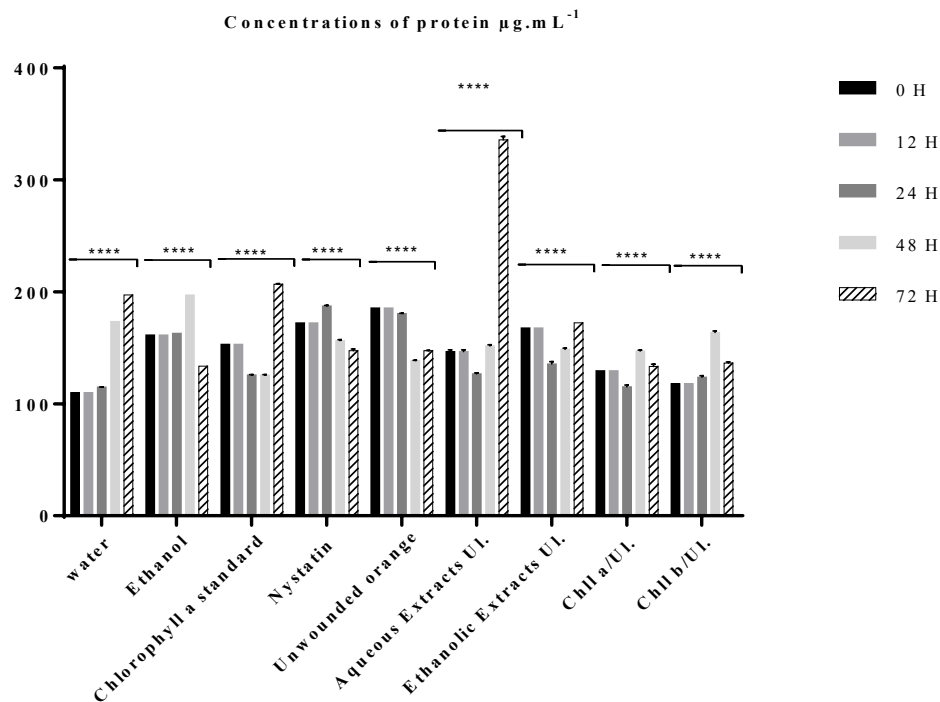


Figure 6: Protein concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of “Valencia late” oranges treated with the aqueous, ethanolic extracts of *Ulva lactuca* (Ul.), their purified chlorophyll a, b, and the protein concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of oranges treated with the different control (Water, ethanol, Nystatin, chlorophyll a standard and unwounded orange). The concentrations were measured at 0 h, 12 h, 24h, 48h and 72h. Values represent in the figure are studied by two-way ANOVA, $p < 0,0001$ ****.

3.5. Enzymatic activity assays

3.5.1. β -1, 3-Glucanase activity

The analysis of the induction kinetics of β -1, 3-Glucanase activity in orange tissues is shown in figure 7. The enzyme activity in all studied extracts sampled at 0 h was stable. These extracts induced a transient increase in β -1, 3-Glucanase activity, starting at 12 h then increasing at 24 h. However, at 48h, a decrease of β -1, 3-Glucanase activity was observed in the almost of tissues treated. This activity increased and reached maximum levels at 72, especially for the *Ulva lactuca* aqueous extracts compared with the untreated tissue and the negative control water.

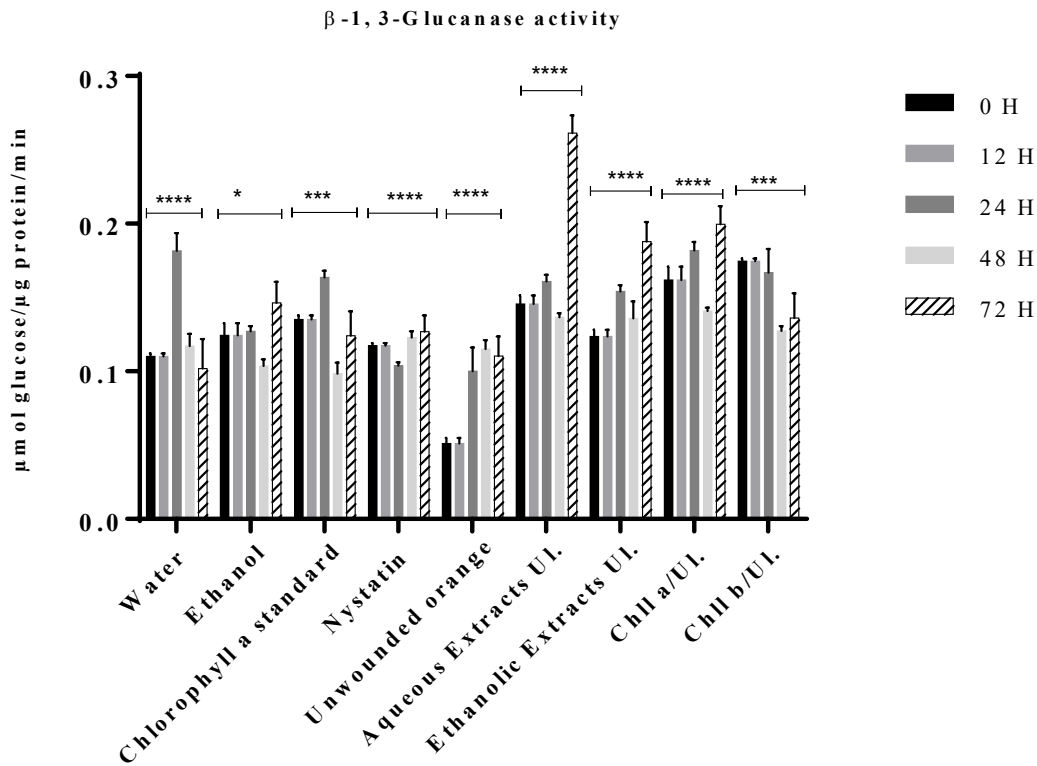


Figure 7: Enzymatic activity of β -1, 3-Glucanase activity in oranges tissues untreated, control or treated with ethanolic, aqueous extracts of *Ulva lactuca* and their purified chlorophyll a, b. Tissues were sampled at 0 h, 12 h, 24 h, 48h and 72 h after application. The activity was measured at 0 h, 12 h, 24h, 48h and 72h. Values represent in the figure are studied by two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test, $p < 0,0001$ ****.

3.5.2. Peroxidase activity

The analysis of the induction kinetics of the peroxidase activity in orange tissues is shown in figure 8. The enzyme activity in all studied extracts sampled at 0 h and 12 was stable. All tissues of orange treated with different extracts induced a transient increase in peroxidase activity, starting at 24 h especially. The treatment with ethanolic, aqueous extracts and chlorophyll a of *U. lactuca* showed an increasing of enzyme activity at 72 h. However, this activity decreased in the unwounded oranges and in the negative control water.

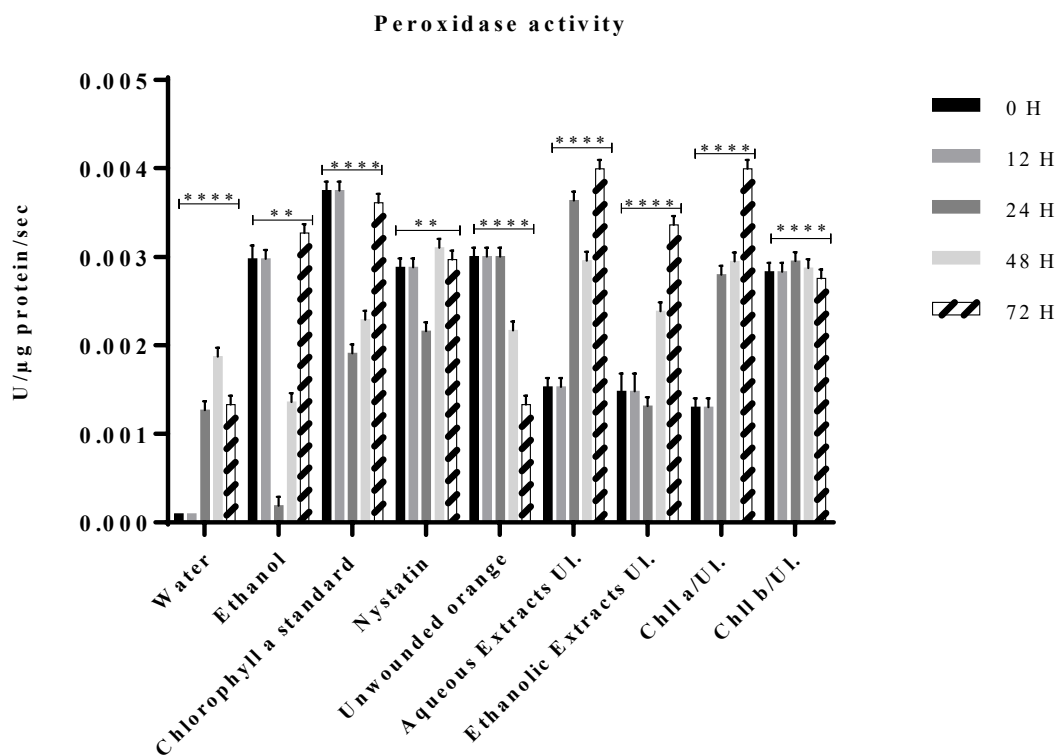


Figure 8: Enzymatic activity of peroxidase activity in oranges tissues untreated or treated with ethanolic, aqueous extracts and chlorophyll a, b of *U.lactuca*. Tissues were sampled at 0 h, 12 h, 24 h, 48h and 72 h after application. Values represent in the figure are studied by two-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test, $p < 0,0001$ ****.

4. Discussion:

The present study showed the efficacy of the green algae *Ulva lactuca* aqueous extracts to limit the contamination of oranges by *P. digitatum* around 75% during 8 weeks of storage at room temperature (Figure 1, Table 2). The *in vivo* trials were conducted to investigate the *Ulva lactuca* extracts mode of action in controlling green mold. A double mode of action was hypothesized on pathogen viability and on the host defense system.

First, whole oranges without wounding were pulverized with only aqueous extracts *U. lactuca*. The percentage for oranges treated with *Ulva lactuca* aqueous extracts and not infected until the end of the test was 75%. However, for the oranges treated only with water (negative control), 33% of them were infected throughout the test. This result has never been observed before. However,

the effect of seaweed extracts has already been studied on other plant species against others fungi (Kulik, 1995; Kosanić and al., 2015; De Corato et al., 2017; Kharchoufi et al., 2018).

The *in vivo* test also was done on an industrial scale, same inhibition efficacy obtained with *Ulva lactuca* aqueous extracts with 90,5%. Even when Decco wax was used in coating citrus especially in case of exporting ad relatively long shipments, numerous citrus wholesales and exporters have indicated that there are still losses (up to 10%) due to fungus.

Second, higher control level was achieved by the extracts (25-35% of infected wounds) especially for the ethanolic extracts and the chlorophyll **a** from *U. lactuca* when applied in wounds nearby those inoculated with the pathogen. Similarly, with regard to disease severity, a significant reduction of lesion diameters was recorded by the ethanolic extracts treatments (22-35mm), where the chlorophyll **a** from *Ulva lactuca* behaved the most efficiently (20 mm) (Figure 5). Furthermore, this study showed that both crude extracts and chlorophyll from *Ulva lactuca* induce changes in the defense mechanism on the fruit surface. In fact, the obtained results showed that when applied in different wound close to the one inoculated with the pathogen, the extracts inhibited the multiplication and development of *Penicillium digitatum*. In order to confirm this hypothesis, changes in β -1.3-glucanase and peroxidase of ‘Valencia late’ oranges were studied.

The protein concentration for tissue of orange treated with the crude aqueous extracts of *Ulva lactuca* was increasing at 72 h ($337 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the chlorophyll **a** ($146.47 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and **b** ($162.49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were reaching a high protein concentration at 48 h (Figure 6). This result in correlation with the enzyme activity, which showed an increase in the β -1.3-glucanase activity in the treated tissues at 24 and 72 h. Moreover, overall the highest activity was recorded in the extracts at 72 h while this activity was decreased in the untreated orange (Figure 7 and 8). The mechanism of *Ulva lactuca* extracts responsible for this process on citrus fruit was not reported before. However, another studies have showed the effects of algae on defense-related responses and decay development in apple fruit (Abouraïcha et al., 2015). Also, other findings demonstrate an increased β -1.3-glucanase activity in citrus fruit by the yeast *Candida oleophila* (Droby et al. 2002), by Sodium carbonate and bicarbonate (Youssef et al., 2014), by the electrolyzed sodium bicarbonate (eNaHCO_3) (Fallanaj et al., 2016) and by Chitosan combined with salicylic acid which activated the defense enzyme activities in grapefruit (Shi et al., 2018).

The β -1,3-glucanase is capable of hydrolyzing fungal cell components (glucans), and it has been shown to inhibit the growth of several pathogenic fungi (Schlumbaum et al., 1986; Sela-Buurlage et al., 1993). It can potentially degrade the fungal cell wall, mainly composed by β -1,3-glucan (van Loon et al. 2006), playing a role in delaying growth, spore germination, and germ tube elongation, and, therefore, decreasing the incidence of *Penicillium digitatum* infection (Ballester et al., 2010).

Concerning the peroxidase, a peak of activity was detected in the tissues of oranges treated with chlorophyll **a** of the green algae *Ulva lactuca* at 72 h, thus suggesting a role of peroxidase in the beneficial effect of the postharvest macroalgae treatment. The efficacy of peroxidase enzyme was also showed by Droby et al., (1993) which demonstrate an increased peroxidase activity in citrus fruit elicited by UV irradiation. Several studies have demonstrated the involvement peroxidase activity in protecting plants against pathogen infection by including a chain of defense reactions (Castoria et al., 2001; Ippolito et al., 2000; Ippolito et al., 2005; Lawrence et al., 2000). Peroxidases play a key role at a later stage in the pathway during the synthesis of lignin, which acts as a cell wall reinforcement enhancing resistance against multiple pathogens and may alter the antioxidant ability of citrus fruit to cope with *Penicillium* infection (Ballester et al. 2006). Peroxidase isoforms have shown to produce H₂O₂ *in vitro* at an alkaline pH, which is characteristically found in the apoplast following pathogen recognition (Bolwell & Wojtaszek, 1997) Moreover, the directed secretion of peroxidases to sites of infection has also been demonstrated (McCluskey et al., 1999).

The β -1,3-glucanase and peroxidase activity were strongly activated by *Ulva lactuca* extracts and by their Chlorophyll at 72 h as compared to other treatments. Both of these enzymes are considered important in host resistance mechanisms since peroxidase is involved in lignin formation (Kuć, 1990). The increase of enzyme concentrations in treated tissues showed that the *Ulva lactuca* extracts and more specifically chlorophyll **a** induced an increase in the enzyme activity, which can play an interesting role in the degradation of the wall cell of pathogens.

The data showed that *Ulva lactuca* extracts and even more Chlorophyll treatments could be promising method to reduce dependency on synthetic fungicides.

3. Conclusion:

In conclusion, *Ulva lactuca* had a significant impact on green mold control in citrus fruit when fruit was exposed to the treatment. The control effect was associated with the inhibition of *P. digitatum* germination and growth, and the induction of host defense-related enzymes.

We found that the aqueous extract and the chlorophyll (a) fraction induce higher enzymatic activities than those of ethanolic extracts and chlorophyll (b) fraction, according to measured concentrations in proteins.

We can confirm that the selection of these extracts rich in polar molecules, such as chlorophyll and polysaccharides, could be promising to prepare alternative eco-friendly formulations to conventional chemical pesticides. Moreover, this work could be used to develop a tool to identify the potential anti-fungal activity of a fraction through the quantification of the protein.

These extracts need further tests, including molecular and biochemical studies for the enzymes in order to isolate the genes encoding for β -1, 3-glucanase from citrus fruit and to gain more insight into the molecular mechanisms involved in citrus fruit responses to various stresses, elicitors, and pathogen attacks.

References:

- Abeles, F. B., and L. E. Forrence., 1970. "Temporal and Hormonal Control of β -1,3-Glucanase in *Phaseolus Vulgaris L.*" *Plant Physiology* 45 (4): 395–400.
- Abouraïcha, E., Z. El Alaoui-Talibi, R. El Boutachfai, E. Petit, B. Courtois, J. Courtois, and C. El Modafar., 2015. "Induction of Natural Defense and Protection against *Penicillium Expansum* and *Botrytis Cinerea* in Apple Fruit in Response to *Bioelicitors* Isolated from Green Algae." *Scientia Horticulturae* 181, 121–28. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.002>.
- Acurio, L. P., D. M. Salazar, A. F. Valencia, D. R. Robalino, A. C. Barona, F. C. Alvarez, and C. A. Rodriguez., 2018. "Antimicrobial Potential of *Chlorella* Algae Isolated from Stacked Waters of the Andean Region of Ecuador." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 151, 012040. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/151/1/012040>.

- Alang, G., Kaur, R., Singh, A., Budlakoti, P., Singh, A. and Singla, P., 2009. “Antimicrobial Activity of *Ulva lactuca* Extracts and Its Fractions.” 3 (pp.107-117.).
- Ambika, S., and K. Sujatha., 2015. “Antifungal Activity of Aqueous and Ethanol Extracts of Seaweeds against Sugarcane Red Rot Pathogen (*Colletotrichum Falcatum*).” *Scientific Research and Essays* 10 (6): 232–35. <https://doi.org/10.5897/SRE2015.6198>.
- Aruna, P., Mansuya, P., Sridhar, S., Kumar, J.S. and Babu, S. 2010. “Pharmacognostical and Antifungal Activity of Selected Seaweeds from Gulf of Mannar Region.” *Recent Research in Science and Technology* 2 (1). <https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/360>.
- Ballester, A. R., A. Izquierdo, M. T. Lafuente, and L. González-Candelas., 2010. “Biochemical and Molecular Characterization of Induced Resistance against *Penicillium digitatum* in Citrus Fruit.” *Postharvest Biology and Technology* 56 (1): 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.10.002>.
- Ballester, A. R., M. T. Lafuente, and L. González-Candelas., 2006. “Spatial Study of Antioxidant Enzymes, Peroxidase and Phenylalanine Ammonia-Lyase in the Citrus Fruit–*Penicillium digitatum* Interaction.” *Postharvest Biology and Technology* 2 (39): 115–24. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.10.002>.
- Bolwell, G. P., and P. Wojtaszek., 1997. “Mechanisms for the Generation of Reactive Oxygen Species in Plant Defence – a Broad Perspective.” *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51 (6): 347–66. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1997.0129>.
- Bradford, M.M. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding” 72(1-2): pp.248-254.
- Carmona-Hernandez, Saul, Juan J. Reyes-Pérez, Roberto G. Chiquito-Contreras, Gabriel Rincon-Enriquez, Carlos R. Cerdan-Cabrera, and Luis G. Hernandez-Montiel. 2019. “Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review.” *Agronomy* 9 (3): 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>.
- Casals, C., N. Teixidó, I. Viñas, J. Cambray, and J. Usall., 2010. “Control of *Monilinia Spp.* on Stone Fruit by Curing Treatments. Part II: The Effect of Host and *Monilinia Spp.* Variables on Curing Efficacy.” *Postharvest Biology and Technology*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301796937>.

- Castoria, R., F. De Curtis, G. Lima, L. Caputo, S. Pacifico, and V. De Cicco., 2001. “*Aureobasidium Pullulans* (LS-30) an Antagonist of Postharvest Pathogens of Fruits: Study on Its Modes of Action.” *Postharvest Biology and Technology* 22 (1): 7–17. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00186-1).
- Chandini, S. Kumar, P. Ganesan, and N. Bhaskar., 2008. “In Vitro Antioxidant Activities of Three Selected Brown Seaweeds of India.” *Food Chemistry* 107 (2): 707–713.
- Chandra, H., Bishnoi, P., Yadav, A., Patni, B., & Mishra, A., 2017. “Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review.” *Plants*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CH2018104579>.
- De Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A., Avella, N., & Patruno, G. 2017. Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. *Postharvest biology and technology*, 131, 16-30.
- Dillard, Cora J., and J. Bruce German., 2000. “Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (12): 1744–56. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000915\)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W).
- Droby, S., E. Chalutz, B. Horev, L. Cohen, V. Gaba, C. L. Wilson, and M. Wisniewski., 1993. “Factors Affecting UV-Induced Resistance in Grapefruit against the Green Mould Decay Caused by *Penicillium Digitatum*.” *Plant Pathology* 42 (3): 418–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01520.x>.
- Droby, S., V. Vinokur, B. Weiss, L. Cohen, A. Daus, E. E. Goldschmidt, and R. Porat., 2002. “Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida Oleophila*.” *Phytopathology* 92 (4): 393–99. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.4.393>.
- Dussault, D., Vu, K.D., Vansach, T., Horgen, F.D. and Lacroix, M., 2016. “Antimicrobial Effects of Marine Algal Extracts and Cyanobacterial Pure Compounds against Five Foodborne Pathogens.” *Food Chemistry* C (199): 114–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.119>.
- Fallanaj, F., Ippolito, A., Ligorio, A., Garganese, F., Zavanella, C. and Sanzani, S.M., 2016. “Electrolyzed Sodium Bicarbonate Inhibits *Penicillium digitatum* and Induces Defence Responses against Green Mould in Citrus Fruit.” *Postharvest Biology and Technology* C (115): 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.009>.

- Hammerschmidt, R., E. M. Nuckles, and J. Kuć. 1982. "Association of Enhanced Peroxidase Activity with Induced Systemic Resistance of Cucumber to *Colletotrichum Lagenarium*." *Physiological Plant Pathology* 20 (1): 73–82. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90025-X).
- Ippolito, A., El Ghaouth, A., Wilson, C.L. and Wisniewski, M., 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, 19(3), pp.265-272.
- Ippolito, A., Schena, L., Pentimone, I. and Nigro, F., 2005. Control of postharvest rots of sweet cherries by pre-and postharvest applications of *Aureobasidium pullulans* in combination with calcium chloride or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 36(3), pp.245-252.
- Jayaraj, J., A. Wan, M. Rahman, and Z. K. Punja. 2008. "Seaweed Extract Reduces Foliar Fungal Diseases on Carrot." *Crop Protection* 27 (10): 1360–66. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.05.005>.
- Jesus, A., Correia-da-Silva, M., Afonso, C., Pinto, M. and Cidade, H., 2019. Isolation and Potential Biological Applications of Haloaryl Secondary Metabolites from Macroalgae. *Marine drugs*, 17(2), p.73.
- Jiménez, E., Dorta, F., Medina, C., Ramírez, A., Ramírez, I. and Peña-Cortés, H., 2011. Anti-phytopathogenic activities of macro-algae extracts. *Marine drugs*, 9(5), pp.739-756.
- Kanetis, L., Förster, H. and Adaskaveg, J.E., 2007. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. *Plant Disease*, 91(11), pp.1502-1511.
- Khazada, A. K., Shaikh, W., Kazi, T. G., Kabir, S., & Soofia, S. 2007. Antifungal activity, elemental analysis and determination of total protein of seaweed, *Solieria robusta* (Greville) Kylin from the coast of Karachi. *Pak. J. Bot*, 39(3), 931-937.
- Kharchoufi, S., Parafati, L., Licciardello, F., Muratore, G., Hamdi, M., Cirvilleri, G. and Restuccia, C., 2018. "Edible Coatings Incorporating Pomegranate Peel Extract and Biocontrol Yeast to Reduce *Penicillium digitatum* Postharvest Decay of Oranges." *Food Microbiology* 74 (September): 107–12. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.011>.
- Kosanić, M., Ranković, B. and Stanojković, T., 2015. Biological activities of two macroalgae from Adriatic coast of Montenegro. *Saudi journal of biological sciences*, 22(4), pp.390-397.

- Kuč, J. 1990. "Immunization for the Control of Plant Disease." *Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens*. 355–73.
- Kulik, M. M. 1995. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *European journal of plant pathology*, 101(6), 585-599.
- Lawrence, C.B., Singh, N.P., Qiu, J., Gardner, R.G. and Tuzun, S., 2000. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(5), pp.211-220.
- Li, J., Li, H., Ji, S., Chen, T., Tian, S. and Qin, G., 2019. Enhancement of biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii* by cinnamic acid against *Penicillium italicum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 149, pp.42-49.
- Liu, A.H., Liu, D.Q., Liang, T.J., Yu, X.Q., Feng, M.T., Yao, L.G., Fang, Y., Wang, B., Feng, L.H., Zhang, M.X. and Mao, S.C., 2013. *Caulerprenylols A and B*, two rare antifungal prenylated para-xylenes from the green alga *Caulerpa racemosa*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(9), pp.2491-2494.
- Macarasin, D., L. Cohen, A. Eick, G. Rafael, E. Belausov, M. Wisniewski, and S. Droby. 2007. "Penicillium digitatum Suppresses Production of Hydrogen Peroxide in Host Tissue During Infection of Citrus Fruit." *Phytopathology* 97 (11): 1491–1500. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-11-1491>.
- Madanipour, S., Alimohammadi, M., Rezaie, S., Nabizadeh, R., Khaniki, G.J., Hadi, M., Yousefi, M., Bidgoli, S.M. and Yousefzadeh, S., 2019. Influence of postharvest application of chitosan combined with ethanolic extract of liquorice on shelflife of apple fruit. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, pp.1-6.
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W. and Bertolini, P., 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 73, pp.56-62.
- Martins, Rosiane M., Fernanda Nedel, Victoria B. S. Guimarães, Adriana F. da Silva, Pio Colepicolo, Claudio M. P. de Pereira, and Rafael G. Lund. 2018. "Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential." *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00412>.

- McCluskey, Peter J., Peter G. Watson, Susan Lightman, John Haybittle, Marie Restori, and Michael Branley. 1999. "Posterior Scleritis: Clinical Features, Systemic Associations, and Outcome in a Large Series of Patients." *Ophthalmology* 106 (12): 2380–86. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(99\)90543-2](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(99)90543-2).
- Palou, L., Smilanick, J.L. and Droby, S., 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 2(2), pp.1-16.
- Prat.R. (2007). *Experminetation en biologie et physiologie vegetale*. Paris: Herman Editeurs.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. and Boller, T., 1986. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, 324(6095), p.365.
- Sela-Buurlage, M. B., A. S. Ponstein, S. A. Bres-Vloemans, L. S. Melchers, PJM van den Elzen, and Bjc Cornelissen. 1993. "Only Specific Tobacco (*Nicotiana Tabacum*) Chitinases and [Beta]-1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity." *Plant Physiology* 101 (3): 857–63. <https://doi.org/10.1104/pp.101.3.857>.
- Shi, Z., Wang, F., Lu, Y. and Deng, J., 2018. Combination of chitosan and salicylic acid to control postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum* in grapefruit fruit. *Scientia horticulturae*, 233, pp.54-60.
- Singh, Dinesh, and R. R. Sharma. 2018. "Chapter 1 - Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management." In *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, edited by Mohammed Wasim Siddiqui, 1–52. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812698-1.00001-7>.
- Soliman, Amira Sh, A Y Ahmed, Siham E Abdel-Ghafour, Mostafa M El-Sheekh, and Hassan M Sobhy. 2018. "Antifungal Bio-Efficacy of the Red Algae *Gracilaria Confervoides* Extracts against Three Pathogenic Fungi of Cucumber Plant," 9.
- Sujatha, R., Siva, D. and Nawas, P., 2019. Screening of phytochemical profile and antibacterial activity of various solvent extracts of marine algae *Sargassum swartzii*. *World Scientific News*, 115, pp.27-40.
- Terol, J., Conesa, A., Colmenero, J.M., Cercos, M., Tadeo, F., Agustí, J., Alós, E., Andres, F., Soler, G., Brumos, J. and Iglesias, D.J., 2007. Analysis of 13000 unique Citrus clusters associated with fruit quality, production and salinity tolerance. *BMC genomics*, 8(1), p.31.

- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
- Xu, C. and Leskovar, D.I., 2015. Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Scientia Horticulturae*, 183, pp.39-47.
- Youssef, K., Sanzani, S.M., Ligorio, A., Ippolito, A. and Terry, L.A., 2014. Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 87, pp.61-69.
- Zhang, H., Mahunu, G.K., Castoria, R., Yang, Q. and Apaliya, M.T., 2018. Recent developments in the enhancement of some postharvest biocontrol agents with unconventional chemicals compounds. *Trends in food science & technology*.

Chapitre 3 : Formulation des extraits aqueux d'*Ulva lactuca*.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les extraits aqueux d'*Ulva lactuca* (UL) ont une activité anti-fongique en se basant sur des tests *in vitro* et *in vivo*. Cette activité peut être attribuée à l'association de différentes molécules actives hydrophiles et polaires telles que les ulvanes, les polyphénols et les pigments hydrosolubles.

Dans ce contexte, la formulation de ces extraits a été proposée dans un objectif de faciliter le transport et le stockage des agrumes. Deux formulations différentes ont été étudiées : d'une part, la microencapsulation des extraits avant leur solubilisation, et d'autre part, leur mise en émulsion après une éventuelle encapsulation. L'activité antifongique *in vitro* a été ensuite réévaluée.

Article III. Activité antifongique des extraits aqueux d'*Ulva lactuca* microencapsulés

Pour le traitement post-récolte des agrumes, il est donc envisageable d'utiliser une solution aqueuse d'extrait d'*U. lactuca* à appliquer sur les agrumes. Cette solution devra être préparée peu de temps avant le traitement, sur le site même du traitement, pour éviter un stockage néfaste à la qualité et à l'efficacité du produit. De ce fait, il est nécessaire de pouvoir conserver l'extrait aqueux en préservant les propriétés des fractions actives et en facilitant leur solubilisation.

Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'un article soumis dans le journal "*Journal of Food Processing and Preservation*". Dans ce travail, nous avons examiné l'intérêt de protéger des fractions bioactives par un procédé de microencapsulation.

La microencapsulation par atomisation est un procédé utile pour la stabilisation des composés actifs provenant de diverses sources naturelles. L'objectif était donc de trouver des conditions adaptées pour la microencapsulation, conditions permettant de préserver l'activité biologique des extraits aqueux d'*Ulva lactuca* pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois.

Deux matériaux d'encapsulation ont été testés : les protéines de soja (SPI) et un mélange 50/50 de protéines de soja et de maltodextrine (SPI + MD). Leur concentration en solution (2% w/w) a

permis de garantir leur dissolution complète et une viscosité appropriée pour la pulvérisation. Les paramètres de séchage, la température d'entrée et le débit d'alimentation (120 °C et 0,33 L /h respectivement) ont été ajustés d'une part pour évaporer le solvant sans altérer les extraits UL et d'autre part pour optimiser le rendement de production. La concentration choisie en extraits UL séchés permet d'obtenir un rapport matériau d'encapsulation / extrait sec de 1 :1 pour les différentes expériences.

Les résultats ont montré des rendements d'atomisation variant de 48 à 62%. Des essais d'atomisation réalisés à partir des extraits éthanoliques ont conduit à un rendement de 45 %. Les microparticules ont des morphologies similaires, les particules à base d'isolats de protéine ayant les diamètres les plus élevés (7,8 – 9 µm).

La capacité des matériaux à préserver les propriétés anti-fongiques a été évaluée après 12 mois de stockage. Les tests *in vitro* ont montré que la microencapsulation avec les deux matériaux n'a pas atténué l'activité anti-fongique initiale des extraits. Cela signifie que les molécules actives n'ont pas été altérées pendant le processus d'encapsulation. Cette étude a montré que les microparticules à base de SPI ont des caractéristiques appropriées pour préserver l'activité antifongique d'un extrait d'algue verte pendant leur stockage. De plus, l'activité anti-fongique détectée pour le SPI semble contribuer au renforcement des propriétés biologiques des extraits. L'autre matériau à base de SPI + MD génère des microparticules présentant une perte d'activité antifongique, pouvant s'expliquer par la perméabilité du revêtement et par le fait que la maltodextrine peut être utilisée par les champignons comme source d'énergie. La solubilisation de ces microparticules dans l'eau peut aisément conduire à la préparation de la solution aqueuse à pulvériser sur les agrumes.

Anti-fungal activity of microencapsulated aqueous extracts from *Ulva lactuca*

Douaa Salim ^{1,3}, Pascale de Caro ³, Vanessa Durrieu ³ and Asma Chbani ^{1,2}

¹ Laboratoire de biotechnologie appliquée, Centre Azm pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Lebanese University, Tripoli, Lebanon.

² Faculté de santé publique III, Université Libanaise, Tripoli, Lebanon.

³ Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France.

* Corresponding author: pascale.decaro@ensiacet.fr.

Running title: Microencapsulation of *Ulva lactuca* extracts

Abstract

Microencapsulation by spray-drying is a process useful for the stabilization of active compounds from various natural sources. The aim of this work was to study the biological activities of aqueous extracts of *Ulva lactuca* and to find adapted conditions to encapsulate them while preserving their properties. The choice of wall materials and spray drying parameters was thus investigated. Drying yields and microparticles characteristics were compared according to the wall materials. The ability of tested material walls (soy protein isolate and maltodextrin) to preserve the active molecules was also evaluated through three different *in vivo* anti-fungal tests. The two materials generated two different behaviors of microparticles in term of antifungal activity towards *Penicillium digitatum*. The results showed that SPI microparticles are able to prevent the loss of the anti-fungal activity of extracts after one year of storage. The anti-fungal activity detected for SPI contributes to strengthening the biological properties of extracts.

Keywords: microencapsulation; spray drying; maltodextrin; soy protein; *Ulva lactuca*; antifungal activity.

Practical applications:

Citrus fruit are frequently contaminated by *Penicillium digitatum* after their harvest. To avoid high citrus losses, developing a safer natural treatment to replace the use of hazardous chemical products, would help to limit sanitary impacts. This study proposes a mean to preserve the

antifungal activity of green seaweed extracts to consider their convenient application on citrus peels.

1. Introduction

Penicillium digitatum is the major source of postharvest decay in citrus fruits worldwide (Poppe and al., 2003). It is one of the most severe postharvest pathogens, causing green mold disease (Ghanei Ghoshkhaneh and al., 2018). This fungus spreads on a number of skin oil glands through pores and wounds in which nutrients are available to stimulate spore germination. The initiation of the infection area appears as a soft watery spot (sometimes referred to as clear rot) on the fruit peel, and if suitable temperature and conditions are available, it becomes a white mycelium that later turns an olive color with spore production (Ismail & Zhang, 2004; Vu et al., 2018). Currently, a number of synthetic fungicides carries out the postharvest control. Nevertheless, the repeated use of certain fungicides has led to the appearance of fungicide-resistant populations of *Penicillium digitatum* (Kanetis and al., 2010) and serious risks for human health and the environmental (Mari and al., 2012). These reasons have encouraged the search for new and safer alternatives to protect fruit from fungi either by using a biocontrol approach (Carmona-Hernandez et al., 2019, Li et al., 2019) or by using natural extracts (Carmona-Hernandez et al., 2019; Li et al., 2019; Madanipour et al., 2019).

In this context, marine algae have been selected as the source of active compounds alternative to replace the chemical fungicides (Sujatha et al. 2019). Antifungal properties of compounds from seaweeds have already been detected to struggle against plant pathogenic fungi (Aruna et al. 2010; Ambika and Sujatha 2015; Soliman et al. 2018, Sujatha et al. 2019). Indeed, biological activities of several natural compounds in aqueous green algae extracts have been identified, such as pigments, polyphenols and ulvan (Chandra et al., 2017; Liu et al., 2013).

In this work, we propose to use the anti-fungal properties of aqueous extracts of *Ulva lactuca*, a green alga available over numerous Mediterranean coasts. Aqueous extracts applied on citrus fruit can prevent the development of *Penicillium digitatum*. To prepare ready-to-use solutions, isolated active fractions must be stored during transportation and before their use. However, some of these molecules lose their activities due to their sensitivity to light and to oxidation reactions. In the present work, we have considered the protection of bioactive fractions by microencapsulation process.

Microencapsulation has been described as a good strategy in food industry for various purposes, such as preservation of functional properties, improved handling and utilization of bioactives (Pires & Pena, 2017; Chang & Nickerson, 2018). Among encapsulation techniques, spray drying is the most common technology applied due to its low cost, flexibility, production of good quality powder particles (Singh and al., 2018). Spray-drying have proved to be an effective technology for encapsulating and protecting bioactive molecules, such as vitamins, antioxidants or polyphenols. (Drosou et al, 2017; Ray et al., 2016). Different types of encapsulating agents have shown their efficiency to protect antioxidants against light and thermal oxidation through the physical barrier (Yuan et al. 2017). The most used with spray-drying technology include proteins (Nesterenko, 2014; Rocha-Guzman, 2010) and various carbohydrates such as maltodextrin, starch or chitosan. (Ray, 2016, Kumar, 2017). Some extracts from fruit such as lemon by-products and tomato or blueberry pomaces (Papoutsis et al., 2018, Robert et al., 2010; Flores et al, 2014) or other extracts from leaves (Gonzalez et al., 2019) have been encapsulated by natural polymers to preserve their quality and to facilitate their use. Algal biomass and algal oil have also been encapsulated by spray-drying (Bonilla-Ahumada et al. 2018, Shao et al., 2018), but encapsulation of active aqueous extracts from seaweeds is not reported.

The objective of this study is to find appropriate conditions to encapsulate the green seaweed *Ulva lactuca* extracts with natural coating materials able to extend their shelf life. The protection efficiency will be assessed by the level of anti-fungal properties, before and after encapsulation.

2. Material and Methods

2.1. Materials

Three different samples of *Ulva lactuca* were studied. Lebanese *Ulva lactuca* (Leb Ul) was freshly and manually collected from a coastal zone of the Mediterranean, El Mina (34 ° 26 'N - 35 ° 50' E) in Tripoli, Lebanon. The algae were cleaned with seawater to remove unwanted impurities. Then cleaned 3 times with distilled water and dried at room temperature until the mass remained constant. The samples were then stored hermetically at room temperature. Two other lots of *Ulva lactuca* (Feed and Food quality: Feed Ul and Food Ul) were purchased from Fujian, China-Mainland (Fuzhou Wonderful Biological Technology Co., Ltd.).

Milli-Q water was used for the different tasks. Maltodextrin (MD) Glucidex IT 12 was purchased from Roquette, Soy protein isolate (SPI) (90% pure) was purchased from Solae Belgium NV (Ieper, Belgium). Phosphate buffered saline (PBS), Nystatin suspension, Ampicillin sodium salt, Streptomycin sulfate salt, Potato dextrose broth, Malt extract agar were purchased from Sigma Aldrich.

2.2. Algae aqueous extract preparation

Algae aqueous extracts were prepared according to Jimenez *et al.* (2011). 5 g of dried algae was put in a 100 mL flask. A volume of 100 mL of boiling Milli-Q water was added. The medium was stirred magnetically for one hour at room temperature. The extract was then filtered twice through a double layer of sterile muslin filter (20 cm x 20 cm). The filtrate was dried in a Memmert incubator (Schwabach, Germany) at 103 ± 2 °C for 12 hours, to obtain a dried extract. The yield of extraction was calculated using the final weight of dried extract according to the following formula:

$$\% \text{ extraction yield} = 100 \times \frac{\text{Final Weight of dried extract}}{\text{Initial weight of dried algae}}$$

Extraction yields are expressed in % w/w dry weight (d.w). The extracts were stored at 4 °C until analysis. The dry matter rate (% dry weight) of liquid extracts (filtrates) was calculated with the following equation:

$$\% \text{ dry weight} = 100 \times \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)}$$

Where, m_0 : crucible tare (g), m_1 : mass of crucible and sample before drying (g), m_2 : mass of crucible and sample after drying (g)

2.3. Chemical composition of *Ulva lactuca* extracts.

2.3.1. Total Polysaccharide content

Polysaccharides were analyzed by ion exchange chromatography with a CarboPac PA1 column (Dionex). The eluent was potassium hydroxide, at a flow rate of 1ml min⁻¹. The following concentration gradient was used: 2mM for 39 min, increasing to 10 mM for 2 min, 100mM for 8 min and 100mM for 3 min. The temperature was set to 25 °C. The injection volume was 25 µl.

External standards were used for polysaccharide identification. Fucose was used as an internal standard for polysaccharide quantification

2.3.2. Ulvan amount determination

20 g of dried seaweed were treated at room temperature with a 4:2:1 MeOH-CHCl₃-H₂O mixture to remove colored matter, filtered and vacuum dried to obtain defatted algal biomass (Bilan et al. 2006). This material was used to extract ulva following the method of (Mao et al. 2006). The resulting alga was placed into 400 mL of water. This solution was continuously stirred and kept at 80–90 °C in a hot-water bath for 2 h. The aqueous extract was centrifuged, and the liquid supernatant was filtered. The water extract was concentrated by a rotary evaporator to reduce the volume. The water extract was centrifuged, filtered and precipitated with 3 vol. of absolute ethanol. The alcohol precipitate was separated, washed several times with ethanol, and dried in a vacuum oven at 40 °C, then re-dissolved in distilled water, and dried to obtain highly purified ulvan.

2.3.3. Total Phenolic content

The total phenolic content of the plant aqueous extracts was determined by the Folin Ciocalteu method. 20 µL of extract, 10 µL of Folin Ciocalteu reagent and 170 µL of sodium carbonate were added to each well of a 96-well microplate. The plate was incubated for 45 min at 45 °C and absorbance was measured at 760 nm with a spectrophotometer (Spectrostar, BMG Labtech). A calibration curve was plotted with a standard solution of gallic acid. Each sample was analyzed in four wells. Results are expressed as grams of gallic acid equivalent per 100 g of sample on a dry basis (GAE/100 g d.b.)

2.3.4. Soluble Protein content

Proteins were quantified by Lowry method (Lowry et al., 1951) using a standard curve of bovine serum albumine (BSA) and a lowry kit (Lowry reagent, bovine albumin standard and 2-N Folin-Ciocalteu reagents) purchased from Thermo Fisher Scientific. A calibration curve was prepared using a concentration range of BSA from 0 500 µg.mL⁻¹. An amount of 0.2 mL of each standard and sample containing the crude protein extract was withdrawn. 1 mL of modified Lowry reagent was added to each sample. They were then vortexed and incubated for exactly 10 min.

After incubation, 100 μL of Folin-Ciocalteu reagent (1 N) was added and again vortexed and incubated for 30 min. The blue-colored solution was then measured at 750 nm with a UV-1800 Shimadzu spectrophotometer.

2.4. Microencapsulation of algae extracts

2.4.1. Preparation of solutions

Two raw materials were tested: soy protein isolates (SPI) and a mixture of soy protein isolates with maltodextrin (SPI+MD) with the ratio 50/50. A dried algal extract was dissolved in an aqueous solution of raw material, using Milli-Q water with gentle magnetic stirring at room temperature. The final concentrations in algal extract and in raw material were 2% (w/w). The solution was kept under constant stirring at room temperature for 30 min before spray-drying step.

2.4.2. Spray-drying

The solutions (125 mL) were spray-dried in a Mini Spray dryer B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland) under the following process conditions: inlet air temperature at 120 ± 4 °C and outlet temperature at 74 ± 4 °C, drying air flow rate of $470 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, liquid feed flow rate of $0.33 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, and 100% aspiration. Microparticles were collected from the cyclone collector, shut hermetically in opaque packaging and stored at 4 °C.

The spray drying yield was evaluated by considering the recovery of product. It is given as a percentage by the ratio between the total recovered product mass (M_p) and the mass of the material initially fed into the system (M_{sp}). The yield is expressed by the following equation:

Where M_p is the dried mass of the powder (microparticles) collected and M_{SP} is the initial mass of solid content in the solution, including soy protein, maltodextrin and algae extracts.

2.5. Characterization of microparticles

2.5.1. Microparticles moisture content

Moisture content of all the obtained powders was determined with infrared moisture balance (Sartorius, Goettingen, Germany) by drying at 105 °C to constant weight.

2.5.2. Microparticle Size Distribution

The size distribution of the microparticles was determined by laser diffractometry with a Sirocco 2000 machine (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A refractive index of 1.52 was used, with an air dispersion pressure of 4 bars. The volume-based particle diameters ($D_{4,3}$) were calculated as the mean of three measurements per sample.

2.5.3. Morphology

Microparticles were observed by scanning electron microscopy (SEM) with a LEO435VP scanning electron microscope (LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, UK) operating at 10 kV. They were deposited on a conductive double-faced adhesive tape and sputter-coated with silver.

2.6. *In vitro* antifungal properties

2.6.1. Preparation of pathogen inoculum

Protocol was adapted from Nicosia et al. (2016). Fungal isolates of *Penicillium digitatum* were obtained from infected oranges and then cultivated on Malt Extract Agar (MEA, Sigma–Aldrich) in order to obtain single conidia colonies. For inoculum growth, cultures were kept at 22 °C for 7–10 days. Obtained spores were then collected using a sterile spatula, diluted in sterile distilled water, and then vortexed for 1 min to ensure uniform mixing. Spore concentration was fixed to 10^8 C.mL⁻¹ using a densitometer (Biosan DEN-1B, McFarland densitometer). The obtained stock solution (10^8 C.mL⁻¹) was then diluted to two solutions; S1= 10^6 C.mL⁻¹ was used for the study of microcapsules effects on spore germination in liquid medium and on germ tube elongation, and S2= 2×10^3 C.mL⁻¹ was used to study of the microparticle effects on fungus viability on solid medium.

2.6.2. Adhesion test on the epidermal orange cells

Protocol was adapted from Kimura and Pearsall (1978). The orange cells were directly taken from a vigorous orange by scratching its outer peel. These cells were then washed in PBS (1 mL/tube), centrifuged at 2500 g for 10 min, and finally re-suspended in 1 mL PBS for counting. *Penicillium digitatum* spores were taken from an infected orange and cultivated on Malt medium for 4 days at room temperature. Spores were then suspended in PBS. Spores and oranges cells' concentrations were evaluated using a densitometer (Biosan DEN-1B, McFarland densitometer). Spores and oranges cells solutions were diluted to obtain concentrations of 10^7 cells/mL and 10^5 cells/mL respectively; 1 mL of orange cells suspension was brought into contact for 1 h with 1 mL of crude extracts solutions ($50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) or microparticles solutions at the same concentration (which correspond to 1 g of the microparticles dissolved in 10 mL autoclaved Milli-Q water). After 1 h of incubation, 1 mL of *Penicillium* spores were added to the various mixtures and the whole mixture was stirred for 2 h at room temperature. After 2 h of incubation, the preparation was washed 3 times in PBS; for a clean wash, 0.5 mL of PBS solution was added each time and the mixture was centrifuged at 2500 g for 10 minutes. The aim of these centrifugations is to eliminate the remaining free spores. The cells being in suspension, the test reading was carried out by the examination of fresh pellet reconstituted in 0.1 mL PBS. The adhesion index is defined as the number of *Penicillium digitatum* spores fixed per orange cell. An index greater than 25 is the indicator of a strong adhesion, whereas, for an index of less than 10, the adhesion is low (Linas 1986). Ten orange cells were examined in triplicate for each extract and the averages of adherent cells were calculated.

2.6.3. Inhibition of germination and germ tube elongation test

12.5 μL of the solution S1 (10^6 C mL^{-1}) were transferred to Eppendorf tubes to which 25 μL of aqueous extract (obtained according to protocol 2.2) or 25 μL of an autoclaved Milli-Q water solution where microparticles were dissolved (1 g in 10 mL). Then 12.5 μL of potato dextrose broth (PDB, Sigma–Aldrich) were added. Sterile ultrapure water (Water), Nystatin, soy protein (SPI) and mixture SPI+MD 50:50 were used as negative and positive controls. The tubes were then mixed and incubated for 20 hours at 22 °C followed by a vortex in order their homogenization. Afterward, 2 μL of spore suspension were transferred to microscope slides, mixed with 2 μL of lactophenol blue, then observed at a magnification of 40 for spore germination and tube elongation. For each slide, three observations were randomly done.

2.6.4. *in vitro* antifungal activity

The determination of the antifungal properties of the extracts on *Penicillium digitatum* was carried out by Disk diffusion test on Malt Extract agar (Sigma Aldrich) previously inoculated by flooding with *P. digitatum*. The microorganisms were grown on Malt Extract agar (Sigma Aldrich) plates at 24 °C for 48 hours prior to seeding into Malt Extract agar (Sigma Aldrich). One or several colonies of a similar morphology of each *Penicillium* were transferred into the sterile distilled water and adjusted to the 0.5 McFarland turbidity standards (10^7 spores/mL suspension). Inoculates of the respective fungi were seeded on Malt Extract agar. The sterile discs were impregnated with 25 µL of the aqueous extract (obtained according to protocol 2.2) or 25 µL of microparticles solutions (1 g of microparticles dissolved in 10 mL of autoclaved Milli-Q water) and then dried at room temperature. The sterile filter discs 6.4 mm in diameter were placed on inoculated agar medium and incubated at 24 °C for 48 hours. Nystatin (100 U/disc) was used as a positive antifungal control. The results were determined from the presence or absence of growth and size of the inhibition zone. The diameter (mm) of the growth inhibition halos caused by the different extracts was measured. All the assays were carried out in triplicate.

2.7. Statistical analysis

Results for the microbiological test were based on three replicates for three experiments (n=9). All extraction and characterization data were presented as mean values \pm standard deviations of three experiments. A two-way ANOVA was performed to identify significant differences among the treatments-control groups. Sidak's and Dunnett's significance test was applied to compare the means of every treatment towards the control. Statistically significant differences are indicated with stars (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3. Results and discussion

3.1. Extraction yield

Extraction yields obtained for *Ulva lactuca* from Lebanon and China are presented in Table 1. The results show that the aqueous extract from Chinese *Ulva lactuca* for Feed has the highest yield in dry matter content ($31.6 \% \pm 0.17$). Chinese *Ulva lactuca* for Food and Lebanese *Ulva lactuca*

have similar extraction yields ($21.7 \% \pm 0.19$ and $20.6 \% \pm 0.11$ respectively). In these conditions, it was possible to get good yields in a short time of extraction (1h).

Table 5: Yields of aqueous extraction of *Ulva lactuca*.

		% dry matter content	Extraction Yield (%)
Chinese <i>Ulva lactuca</i>	Food UI	1.7 % \pm 0.4	21.7 % \pm 0.2
	Feed UI	2.1 % \pm 0.2	31.6 % \pm 0.2
Lebanese <i>Ulva lactuca</i>	Leb UI	1.6 % \pm 0.4	20.6 % \pm 0.1

The chemical composition of the aqueous extract was characterized in term of polysaccharides, proteins and polyphenols contents. In the case of ulvan, contents were determined from algae biomass et not from the extracts. The higher the ulvan content in seaweed, the richer the aqueous extract is in ulvan.

Table 6: Chemical characterization of *Ulva lactuca* samples

	Total polysaccharides (g/ 100g DM)	Ulvan (g / 100 DM)	Soluble proteins (g/100 g DM)	Total polyphenols (g/100 g)
Ch Food UI	11.7 \pm 0.04	6.3 \pm 0.1	3.2 \pm 0.4	9.0 \pm 0.6
Ch Feed UI	13.0 \pm 0.03	9.8 \pm 0.4	1,7 \pm 0.3	6.0 \pm 0.7
Lebanon UI	15.5 \pm 0.04	18.5 \pm 1.2	5.4 \pm 0.1	6.0 \pm 0.1

Other water-soluble compounds present in the commercial Food and Feed grade samples can explain the higher extractions yield obtained, compared to Lebanese *Ulva lactuca*;

3.2. Microparticles preparation and characterization

Spray-drying was used to produce SPI and SPI+MD microparticles loaded with UL aqueous extracts. Several parameters have an influence on microencapsulated products final characteristics: the properties of the encapsulating materials, the formulation parameters and operating conditions (Paulo & Santos, 2017). For the experiments, two encapsulating materials were tested: soy proteins (SPI) and a mixture 50/50 of soy proteins and maltodextrin (SPI + MD). Their concentration in the solution was kept constant (2% w/w), to ensure their complete dissolution and a suitable

viscosity for spraying. Concerning the spray-drying parameters, inlet temperature and feed flow (120 °C and 0.33 L/h respectively) were adjusted to evaporate correctly the solvent without altering the UL extracts and to optimize the production yield. The concentration of dried UL extracts was set at 2% w/w, to obtain a 1:1 encapsulating material/dry extract ratio for the different experiments. The spray-drying yields (Table 2) varying from 48 to 62 %, were in accordance with previous works dealing with the same encapsulating materials. Indeed, the production yields reported for microencapsulation with plant proteins range from 50 to 70% (Nesterenko et al., 2012; Wang et al., 2015) whereas those obtained for maltodextrin based microencapsulation are rather around 50% (Santiago-Adame et al., 2015; Tolun and al., 2016). Moreover, the results demonstrate that combining two encapsulating materials allowed to increase spray-drying yield, as previously observed by (Rodriguez et al., 2015). Spray drying yields also depends on *Ulva lactuca* origin thus confirming that the compositions of aqueous extracts are different.

Microparticles moisture contents (Table 2) varied from 2.4 % to 3.1%, which is in the range ensuring microbiological stability of the extracts (Mendanha et al., 2009). We can notice that the moisture values were slightly lower for microparticles produced with SPI than for the one with SPI + MDX.

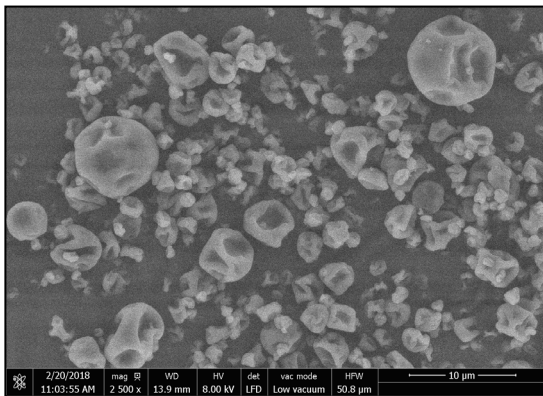
Table 7: Properties of Loaded Spray-Dried Microparticles.

	Spray-drying yield (%)	Moisture content of microparticles (%)	Microparticles mean diameter
			($D_{4,3}$) μm
SPI	54	2,7	4.22 \pm 0.04
SPI + MD	54	2,7	3.90 \pm 0.01
Food UI/SPI	53	2.7	9.01 \pm 0.12
Feed UI/ SPI	48	2.4	7.80 \pm 0.41
Leb UI/ SPI	58	2.9	9.01 \pm 0.12
Food UI/SPI+MD	62	3.1	6.08 \pm 0.01
Feed UI/ SPI+MD	58	2.9	4.58 \pm 0.08
Leb UI/ SPI + MD	60	3.0	5.34 \pm 0.04

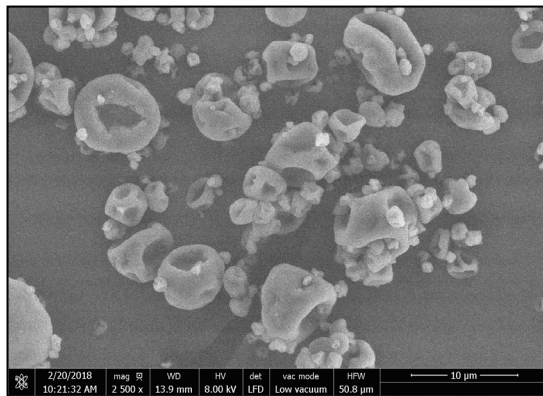
Mean microparticle diameters ranged from 3.9 to 9.0 μm (Table 3), which is consistent with published values for SPI and MD based microparticles (Nesterenko and al., 2014). Particles produced with SPI+MDX are slightly smaller than those made with SPI whatever the UL extract. Similar findings were made by (Pang et al., 2014) who suggested that this result could be correlated to the higher viscosity of protein solution compared to the protein/maltodextrin solution at a similar

solid concentration. Whatever the encapsulating material, microcapsules with Feed UL extract have smaller diameter than the two other extract microparticles.

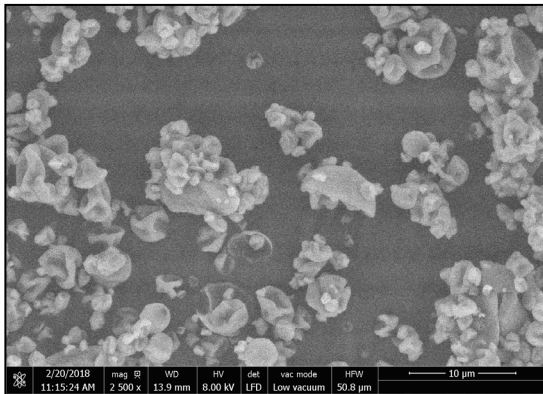
The obtained values were confirmed by SEM observations (Figure 1). Produced microparticles were spherical and of regular shape, but with a slightly cracked surface. No significant difference was observed between encapsulating materials of UL extracts, other than the mean diameter of the microparticles.



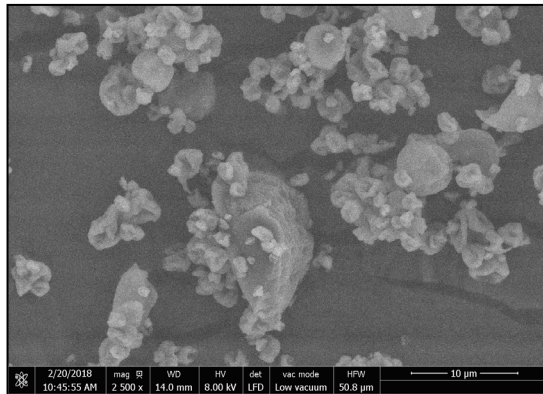
Empty SPI+MD microparticles



Empty SPI microparticles



Feed Ul extract encapsulated in SPI+MD



Feed Ul extract encapsulated in SPI

Figure 1: Scanning electron micrographs of microparticles

3.3. *In vitro* antifungal properties

In vitro antifungal properties were studied for aqueous extracts of *Ulva lactuca* (Ch.Fe UI, Ch.Fo UI and Leb UI) and for aqueous extracts encapsulated with the two coating materials. The measurement of antifungal activity was performed both on fresh samples and on samples stored for one year at 20°C in closed flasks away from light. Microcapsules were dissolved in water (2 %w/w) before assessing anti-fungal properties.

3.3.1. Adhesion test on the epidermal orange cells.

Figure 2 shows the adhesion levels of *P. digitatum* spores to the epidermal cells of oranges in the presence of microparticles and aqueous extracts. The three aqueous extracts demonstrated interesting anti-adhesion properties, even after one year of storage.

We observed the AI of aqueous extracts were very similar to the adhesion index of microparticles obtained with SPI. The other material (SPI+MD) seems to increase the index adhesion due to the presence of maltodextrin. Indeed, maltodextrin may contribute to the growth cycle of fungi. This result is an agreement with the adhesion index of pure materials $AI_{SPI+MD} = 45$ higher than $AI_{SPI} = 16$.

The values obtained show that the microparticles performed with SPI preserved the anti-adhesion properties after one year of storage. It means that SPI seems to be an efficient coating to protect the activity of the extracts. However, the microparticles performed with SPI+MD showed increasing adhesion index above 25, compared to non-encapsulated extracts. Two hypotheses can be done to explain this result: the permeability of the coating may lead to reduced activities of the extracts after one year, or the maltodextrin may be used by the fungi as a source of energy.

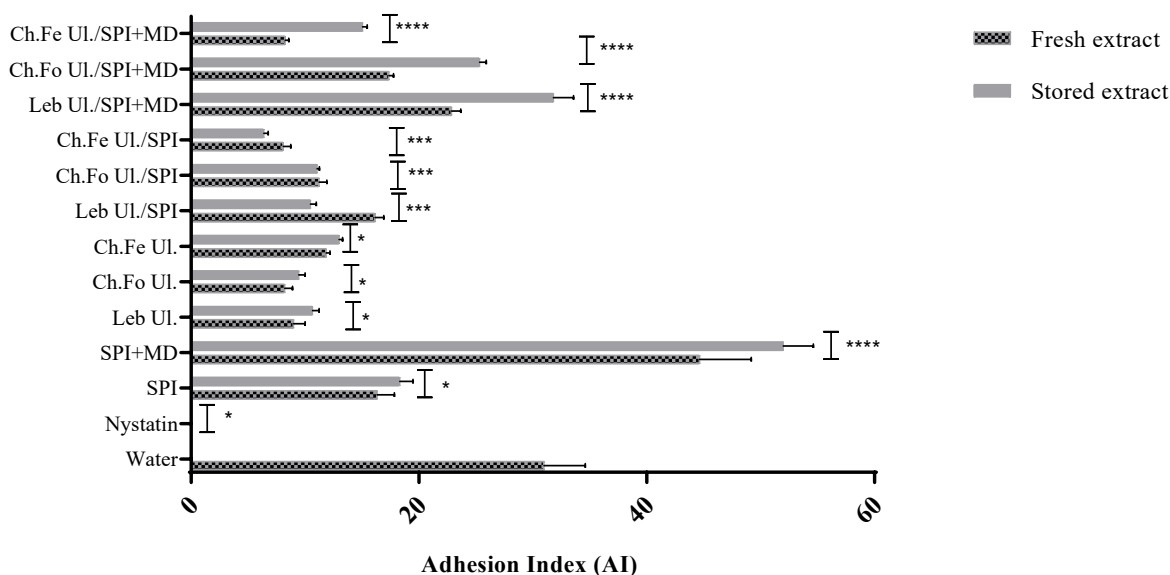


Figure 2: Adhesion index of *P. digitatum* to the orange's epidermal cells in the presence of *Ulva lactuca* extracts (encapsulated or non-encapsulated). Values in the figure are studied by a two-way ANOVA, (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.3.2. Inhibition of germination and germ tube elongation test.

On figure 3, we can observe that fresh aqueous extracts generate high inhibitions of germination (around 75%), values which decrease after one year of storage. Surprisingly, we found that SPI material has an anti-fungal activity, as suggested in the previous test. Therefore, the encapsulation of *Ulva lactuca* aqueous extracts by SPI improved the initial inhibition of germination of fresh extracts, due to SPI barrier effect (Liu et al. 2017) and to its own activity. If SPI material allows to limit the inhibition of germination of extracts after one year, microparticles based on SPI+MD showed a significant decrease of the inhibition of germination of *P. digitatum* after one year.

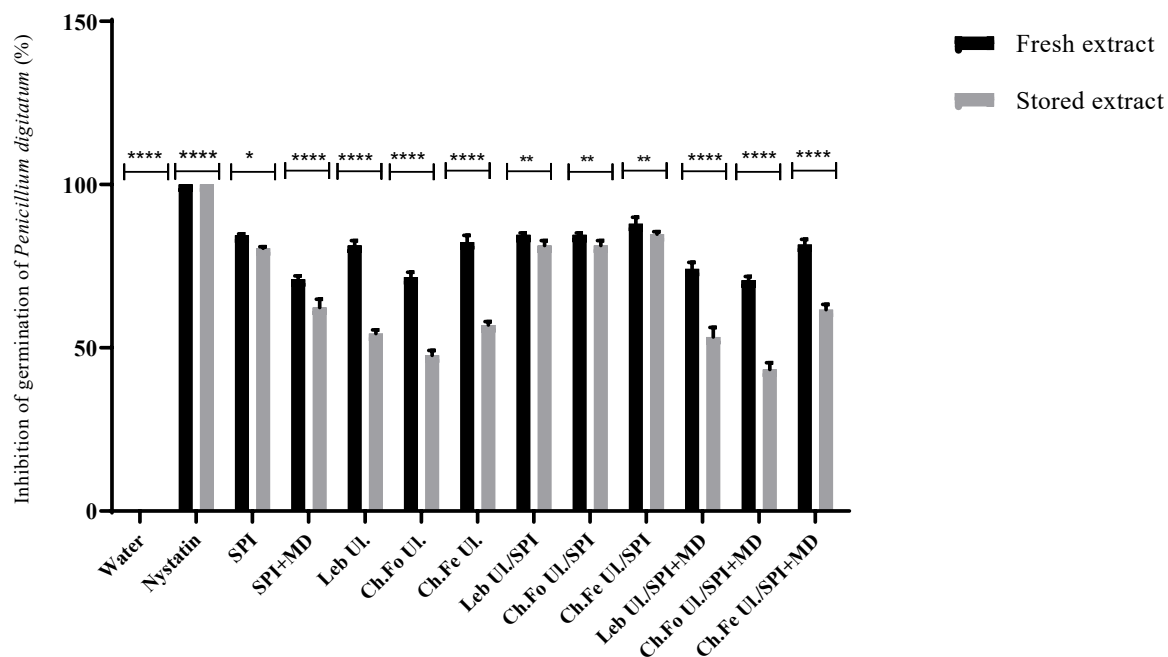


Figure 3: Inhibition of germination of *P. digitatum* by *Ulva lactuca* extracts (encapsulated or non-encapsulated). Values in the figure are studied by a two-way ANOVA (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$).

3.4. *In vitro* antifungal activity

The antifungal activities of extracts and microparticles were assessed according to the agar diffusion method on discs.

According to table 4, the aqueous extracts encapsulated with SPI showed high inhibition zone diameters for the three extracts (16-21 mm) corresponding to a better activity compared to the non-encapsulated aqueous extracts (fresh or stored). Thus, the SPI encapsulated feed extracts almost reached the nystatin zone diameter (23.3 mm). This result indicates that SPI coating contributes itself to the global anti-fungal activity of microparticles, while efficiently protecting the initial antifungal activity of the extracts. Besides, several works (Gonzalez-Estrada *et al.*, 2017; Wu *et al.* 2019) suggested that SPI based films have interesting properties to preserve food from different microbiological contaminations.

Conversely, the microparticles made with the mixture SPI+MD (50:50) exhibited a decrease of the inhibition zone diameter compared to the non-encapsulated aqueous extracts, in particular for Lebanese and feed *Ulva lactuca*. This result confirms that the maltodextrin used for coating enhances the fungi development.

Table 4: Inhibition zones measured around the wells for extracts and microparticles after one-year storage(a value corresponds to a mean \pm SD of triplicates)

<i>Penicillium digitatum</i>		Inhibition zone diameter (mm)
Control	Nystatin	23.3 \pm 1.5
	water	0 \pm 0
	Soy protein isolates	13.5 \pm 2.1
	SPI/MD	2.8 \pm 0.2
Lebanese Ul	Fresh aq. extract	15.1 \pm 0.2
	Stored aq; extract	13.0 \pm 0.3
	Stored microp. SPI	16.1 \pm 0.1
	Stored microp. SPI/MD	8.3 \pm 0.0
Feed Grade Ul	Fresh aq. extract	14.2 \pm 0.1
	Stored aq; extract	11.1 \pm 0.2
	Stored microp. SPI	21.5 \pm 0.0
	Stored microp. SPI/MD	5 \pm 0.0
Food Grade Ul	Fresh aq. extract	13.5 \pm 1.1
	Stored aq. extract	12.5 \pm 0.1
	Stored microp. SPI	16.3 \pm 0.0
	Stored microp. SPI/MD	13.2 \pm 0.2

To conclude the assessment of extracts properties, the three tests are in agreement to show that aqueous extracts of *Ulva lactuca* have anti-fungal activities linked to the presence of active molecules. The ulvan content of Lebanese sample may explain its slightly better activity than the two other fresh samples, observed for the three tests.

When *Ulva lactuca* extracts were coated with SPI, they presented the highest anti-fungal activity after the storage period, results attributed both to the chemical structure of soy protein forming an efficient barrier and to the size of SPI particles which minimizes the exchange surface compared to SPI + MD particles. The three tests also highlighted a noticeable SPI anti-fungal activity, interesting for the target application.

4. Conclusion

Ulva lactuca aqueous extracts were successfully encapsulated using soy protein and a mixture of soy protein- maltodextrin (50:50) as coating agents. We observed that drying yields and particles sizes depend on *Ulva lactuca* origin and on wall material. Microparticles have a similar morphology. Microencapsulation with both materials did not reduce the anti-fungal activity,

according to the three *in vitro* tests. It means that the active molecules were not altered during the encapsulation process. This study showed that microparticles based on SPI have suitable characteristics to preserve the antifungal activity of a green seaweed extract during their storage. The other material made of SPI+MD generates microparticles showing a loss of antifungal activity probably due to the interactions between maltodextrin and fungi, meaning once more that the choice of a coating material must be carefully done. The solubilization of these microparticles in water easily led to the preparation of the aqueous solution to spray on the citrus fruit.

References

- Ambika, S., & Sujatha, K. (2015). Antifungal activity of aqueous and ethanol extracts of seaweeds against sugarcane red rot pathogen (*Colletotrichum falcatum*). *Scientific Research and Essays*, 10(6), 232-235. <https://doi.org/10.5897/SRE2015.6198>
- Aruna, P., Mansuya, P., Sridhar, S., Kumar, J.S. and Babu, S. (2010). Pharmacognostical and antifungal activity of selected seaweeds from Gulf of Mannar region. *Recent Research in Science and Technology*, 2(1).
- de Jesús Bonilla-Ahumada, F., Khandual, S., & del Carmen Lugo-Cervantes, E. (2018). Microencapsulation of algal biomass (*Tetraselmis chuii*) by spray-drying using different encapsulation materials for better preservation of beta-carotene and antioxidant compounds. *Algal research*, 36, 229-238.
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review. *Agronomy*, 9(3), 121. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>

- Chandra, H., Bishnoi, P., Yadav, A., Patni, B., Mishra, A. P., Nautiyal, A. R., Nautiyal, A. R. (2017). Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials—A Review. *Plants*, 6(2), 16.
<https://doi.org/10.3390/plants6020016>
- Chang, C., & Nickerson, M. T. (2018). Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich oils using protein-based emulsions with spray drying. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 2850-2861. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3257-0>
- Drosou, C. G., Krokida, M. K., & Biliaderis, C. G. (2017). Encapsulation of bioactive compounds through electrospinning/electrospraying and spray drying: A comparative assessment of food-related applications. *Drying Technology*, 35(2), 139-162.
- Flores, F. P., Singh, R. K., & Kong, F. (2014). Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material. *Journal of Food Engineering*, 137, 1-6.
- Ghanei Ghooshkhaneh, N., Goltzarian, M. R., & Mamarabadi, M. (2018). Detection and classification of citrus green mold caused by *Penicillium digitatum* using multispectral imaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(9), 3542-3550.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.8865>
- González, E., Gómez-Caravaca, A. M., Giménez, B., Cebrián, R., Maqueda, M., Martínez-Férez, A., & Robert, P. (2019). Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 279, 40-48.
- González-Estrada, R. R., Calderón-Santoyo, M., Ragazzo-Sánchez, J. A., Peyron, S., & Chalier, P. (2018). Antimicrobial soy protein isolate-based films: physical characterization, active

- agent retention and antifungal properties against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(4), 921-929.
- Ismail, M., & Zhang, J. (2004). Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks on Pest Management*, 15(1), 29
- Jiménez, E., Dorta, F., Medina, C., Ramírez, A., Ramírez, I., & Peña-Cortés, H. (2011). Anti-Phytopathogenic Activities of Macro-Algae Extracts. *Marine Drugs*, 9(5), 739-756.
<https://doi.org/10.3390/md9050739>
- Kanetis, L., Förster, H., & Adaskaveg, J. E. (2010). Determination of Natural Resistance Frequencies in *Penicillium digitatum* Using a New Air-Sampling Method and Characterization of Fludioxonil- and Pyrimethanil-Resistant Isolates. *Phytopathology*, 100(8), 738-746. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-8-0738>
- Kimura, L. H., & Pearsall, N. N. (1978). Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 21(1), 64-68.
- Kumar, L. R., Chatterjee, N. S., Tejpal, C. S., Vishnu, K. V., Anas, K. K., Asha, K. K., ... & Mathew, S. (2017). Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying: Characterization and oxidative stability studies. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1986-1995.
- Li, J., Li, H., Ji, S., Chen, T., Tian, S., & Qin, G. (2019). Enhancement of biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii* by cinnamic acid against *Penicillium italicum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 42-49.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.018>
- Liu, A.-H., Liu, D.-Q., Liang, T.-J., Yu, X.-Q., Feng, M.-T., Yao, L.-G., Mao, S.-C. (2013). Caulerprenylols A and B, two rare antifungal prenylated para-xylenes from the green alga

Caulerpa racemosa. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(9), 2491-2494.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.038>

- Liu, Y., Zhang, H., Chi, Y., Wu, Y., Cao, W., Li, T., & Xu, L. (2017). Properties of soy protein isolate antimicrobial films and its application in preservation of meat. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 589-600.
- Madanipour, S., Alimohammadi, M., Rezaie, S., Nabizadeh, R., Jahed Khaniki, G., Hadi, M., Yousefzadeh, S. (2019). Influence of postharvest application of chitosan combined with ethanolic extract of liquorice on shelflife of apple fruit. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s40201-019-00351-4>
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., & Bertolini, P. (2012). Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 73, 56-62.
- Mendanha, D. V., Ortiz, S. E. M., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., & Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42(8), 1099-1104.
- Nesterenko, A., Alric, I., Violleau, F., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2014). The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. *Food hydrocolloids*, 41, 95-102.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. (2012). Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*, 48(2), 387-396.

- Nicosia, M. G. L. D., Pangallo, S., Raphael, G., Romeo, F. V., Strano, M. C., Rapisarda, P., & Schena, L. (2016). Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biology and Technology*, *114*, 54-61.
- Pang, S. F., Yusoff, M. M., & Gimbin, J. (2014). Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. *Food Hydrocolloids, Complete* (37), 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.022>
- Papoutsis, K., Golding, J., Vuong, Q., Pristijono, P., Stathopoulos, C., Scarlett, C., & Bowyer, M. (2018). Encapsulation of Citrus By-Product Extracts by Spray-Drying and Freeze-Drying Using Combinations of Maltodextrin with Soybean Protein and κ -Carrageenan. *Foods*, *7*(7), 115.
- Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*, *C* (77), 1327-1340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>
- Pires, F. C. S., & Pena, R. da S. (2017). Optimization of spray drying process parameters for tucupi powder using the response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(11), 3459-3472. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2803-5>
- Poppe, L., Vanhoutte, S., & Höfte, M. (2003). Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology*, *109*(9), 963-973.
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, *13*, 76-83.

- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1386-1394.
- Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., Harte, F., Medina-Torres, L., Ochoa-Martínez, L. A., & Soto-García, M. (2010). Effect of high-pressure homogenization on the physical and antioxidant properties of *Quercus resinosa* infusions encapsulated by spray-drying. *Journal of food science*, 75(5), N57-N61.
- Rodriguez, O., Carolina, M., Carriazo, J. G., Iturriaga, L. B., Nazareno, M. A., & Osorio, C. (2015). *Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (Opuntia ficus-indica) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.090>
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., & Bernad-Bernad, M. J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 571-577.
- Shao, W., Pan, X., Liu, X., Teng, F., & Yuan, S. (2018). Microencapsulation of algal oil using spray drying technology. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 65.
- Singh, J., Kaur, K., & Kumar, P. (2018). Optimizing microencapsulation of α -tocopherol with pectin and sodium alginate. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3625-3631. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3288-6>
- Soliman, A. S., Ahmed, A. Y., Abdel-Ghafour, S. E., El-Sheekh, M. M., & Sobhy, H. M. (2018). Antifungal bio-efficacy of the red algae *Gracilaria confervoides* extracts against three pathogenic fungi of cucumber plant. *Middle East J Appl Sci*, 8, 727-735.

- Sujatha, R., Siva, D., & Nawas, P. M. A. (2019). Screening of phytochemical profile and antibacterial activity of various solvent extracts of marine algae *Sargassum swartzii*. *World Scientific News*, 115, 27-40.
- Tolun, A., Altintas, Z., & Artik, N. (2016). Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of biotechnology*, 239, 23-33.
- Vu, T. X., Ngo, T. T., Mai, L. T. D., Bui, T.-T., Le, D. H., Bui, H. T. V., ... Tran, V.-T. (2018). A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization. *Journal of Microbiological Methods*, 144, 134-144.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.019>
- Wang, Z., Ju, X., He, R., Yuan, J., & Wang, L. (2015). The Effect of Rapeseed Protein Structural Modification on Microstructural Properties of Peptide Microcapsules. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8), 1305-1318. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1472-5>
- Wu, J., Sun, Q., Huang, H., Duan, Y., Xiao, G., & Le, T. (2019). Enhanced physico-mechanical, barrier and antifungal properties of soy protein isolate film by incorporating both plant-sourced cinnamaldehyde and facile synthesized zinc oxide nanosheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 180, 31-38.

Article IV. Extraits d'algues vertes formulés avec des ingrédients biosourcés pour la conservation des agrumes après récolte.

La seconde approche étudiée pour préparer une formulation, vaporisable et adaptée au traitement des agrumes, est la réalisation d'une émulsion à partir de l'extrait aqueux d'*Ulva lactuca*.

La pulvérisation de l'extrait aqueux nécessite quelques précautions car elle génère un rebond des gouttelettes sur la surface à traiter, une lixiviation et finalement des pertes d'une partie du produit. De ce fait, un autre type de formulation à base d'une émulsion huile dans eau comprenant l'extrait aqueux d'*Ulva lactuca* a été considéré. Ce type de formulation présente également l'avantage de limiter la consommation en molécules actives. De plus, la viscosité de l'émulsion végétale doit faciliter l'adhérence des fractions actives à la surface des agrumes, en évitant les coulures du produit. Le séchage de la formulation s'accompagne de la formation d'un film d'huile végétale protecteur à la surface de la peau.

Pour stabiliser l'émulsion, des agents émulsifiants biosourcés dérivés de l'acide *trans*-aconitique ont été synthétisés en respectant les principes de la chimie verte. Ces composés ont pour rôle de disperser l'huile végétale dans l'extrait aqueux d'*Ulva lactuca*. C'est pourquoi, l'acide *trans*-aconitique provenant des vinasses de canne à sucre, a été estérifié par un alcool gras pour synthétiser des aconitates d'alkyle (Figure 25) selon un procédé qui minimise les impacts environnementaux. Les conditions réactionnelles, sans ajout de catalyseur et sans tiers solvant, peuvent être ajustées (ratio des réactifs et température) pour orienter la réaction vers la catégorie d'esters (aconitates de monoalkyle, de dialkyle ou de trialkyle) la plus adaptée à l'émulsion visée.

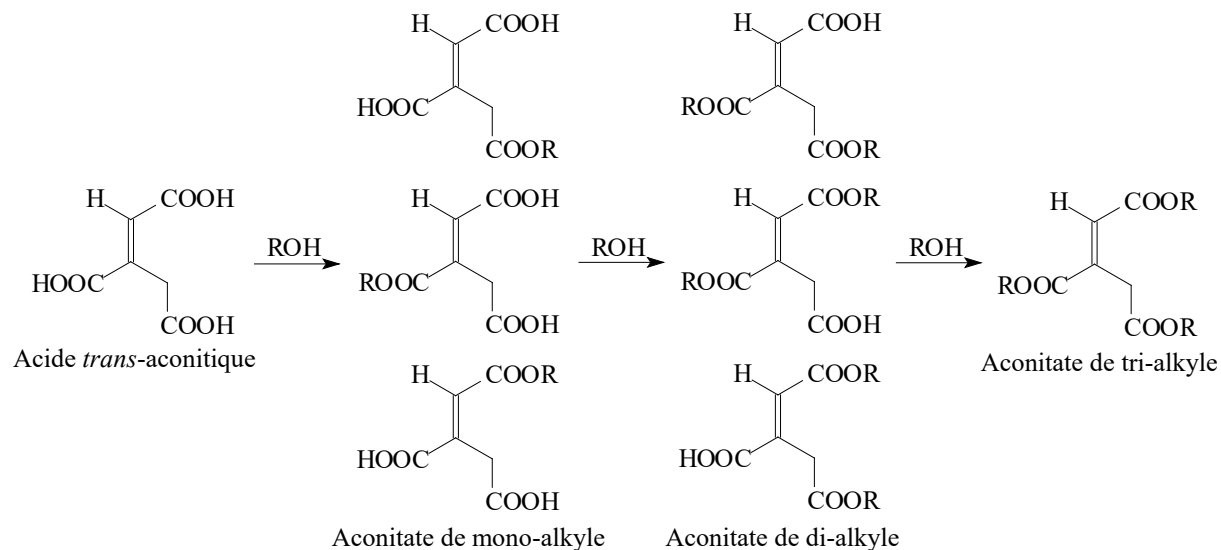


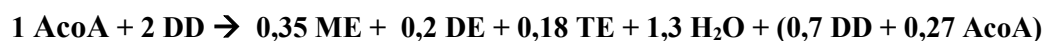
Figure 24: Schéma de l'estérification de l'acide aconitique.

Les esters d'aconitates ont été caractérisés par leur balance lipophile-hydrophile (HLB) et leur tension-superficielle. La stabilité des émulsions a été évaluée par le suivi de l'indice de crémage. La taille des gouttes d'huile et la viscosité des émulsions ont été également mesurées.

Les résultats ont montré que les teneurs en monoesters et diesters sont plus élevées pour la réaction avec le dodécanol (comparé à l'alcool oléique), et en limitant le temps de réaction à deux heures. A l'inverse, un temps de réaction rallongé à 3 heures et un ratio alcool : AcoA égal à 3 (au lieu de 2) favorisent la conversion du dodécanol et augmente la proportion de triester.

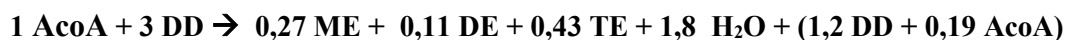
Les indicateurs de la chimie verte ont été calculés à partir des équations bilan des réactions mises en oeuvre. L'acide aconitique, le dodécanol, les monoesters, les diesters ainsi que les triesters sont désignés par AcoA, DD, ME, DE et TE respectivement.

Les conditions de synthèse conduisant à un mélange riche en aconitates de monododécyle et de didodécyle (70%) génèrent l'équation suivante :



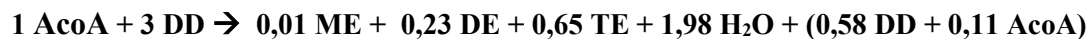
Le taux de conversion de l'acide aconitique atteint alors 73%.

En augmentant le ratio dodecanol/AcoA, le mélange obtenu contient 66% d'aconitate de tridodecyle, avec l'équation suivante :



Dans ce cas, le taux de conversion de l'acide aconitique est égal à 81 %.

En augmentant le temps de réaction d'une heure, la teneur en aconitate de tridodécyle passe à 73,5% , selon l'équation suivante :



Le taux de conversion de l'acide aconitique est égal à 89%.

L'économie d'atome ou Atom economy (AE) reflète l'incorporation des réactifs dans le produit final. Les coefficients stoechiométriques sont ceux des équations déterminées ci-dessus.

Si le produit visé est le mélange d'aconitates, la formule est la suivante appliquée dans le tableau 16 :

$$AE = \frac{v_{ME}M_{ME} + v_{DE}M_{DE} + v_{TE}M_{TE}}{v_{AcoA}M_{AcoA} + v_{DD}M_{DD}} \times 100$$

Tableau 16: Economie d'atome (AE) calculées pour la synthèse des esters d'aconitate.

Experiment	Target compound content	AE (%)
Aconitate de mono/di dodecyle	70 %	86,8
Aconitate de tridodecyle	66 %	89,9
Aconitate de tridodecyle	73.50 %	91,4

Les trois conditions d'estérification conduisent à des économies d'atome élevées. Lorsque la teneur en triester augmente, nous pouvons vérifier que l'économie d'atome est plus élevée.

Le facteur environnemental ou Environmental factor (E-Factor) permet de comparer les quantités de déchets générées par la réaction rapportée à la quantité de produits formés :

$$E - factor = \frac{m_{waste}}{m_{product}} = \frac{m_{AcoA}}{m_{ME} + m_{DE} + m_{TE}}$$

Pour le calcul, l'acide aconitique est considéré comme le seul déchet généré par la réaction, ce qui donne les valeurs de E-factors du tableau 17.

Tableau 17: E-factors calculés pour la synthèse des aconitates d'esters.

Experiment	Target compound content	E-factor
1	70%	0.14
4	66%	0.075
5	73.50%	0.034

Les conditions conduisant au triester présentent des E-facteurs réduits, car la synthèse du triester implique un taux de conversion d'acide aconitique plus élevé que pour les monoesters et diesters. Si le dodécanol qui n'a pas réagi était inclus dans les déchets, le E-factor augmenterait.

L'efficacité massique de la réaction (ou Mass efficiency Reaction) de la réaction est calculée avec la formule suivante :

$$MER = \frac{m_{ME} + m_{DE} + m_{TE}}{m_{AcoA} + m_{DD}} \times 100$$

Tableau 18: Calcul de l'efficacité massique de la synthèse des aconitates d'esters.

Experiment	Target compounds content	Mass efficiency of the reaction (%)
1	70 %	64
4	66 %	60
5	73.50 %	76,4

Le tableau 18 montre que l'enrichissement du milieu en triester augmente l'efficacité massique de la réaction. En conservant le dodécanol dans la composition finale, l'efficacité massique s'en trouve encore améliorée.

Au total, les valeurs des indicateurs sont en accord avec les principes de la chimie verte. La comparaison des indicateurs verts montre clairement que l'enrichissement du milieu en composés cibles, le taux de conversion de l'acide aconitique et la conservation du dodécanol dans le milieu agissent favorablement sur les aspects chimie verte. La présence de dodécanol au sein des aconitates augmente le HLB résultant, ce qui est favorable pour la préparation des émulsions huile-dans-eau. Le dodécanol ainsi conservé dans le milieu peut jouer le rôle comme un co-émulsifiant.

Les caractéristiques physico-chimiques des émulsions ont montré que les aconitates de monododecyle et de didodécyle conduisent à des émulsions plus stables (indice de crémage inférieur) que celles stabilisées par les tridodécyles aconitates.

Les résultats indiquent que l'émulsification de l'extrait aqueux est favorable à son activité anti-fongique vis-à-vis du *Penicillium digitatum*, en limitant l'ampleur de la contamination. Les tests *in vitro* avec les nouveaux ingrédients montrent également que les esters d'aconitate purs ont une activité anti-fongique au moins égale à celle de l'extrait aqueux.

Les tests *in vivo* avec les émulsions avec des extraits d'algues ont montré un pourcentage d'inhibition de l'infection de 88,9% après 6 semaines de traitement au lieu de 83% pour les oranges traitées uniquement avec l'extrait d'*Ulva lactuca* et de 22 % pour les oranges non traitées.

La formation d'un film lipidique à la surface du fruit contribue à limiter l'infection, car il agit comme une barrière protectrice vis-à-vis de la germination des champignons. Les émulsions ne contiennent que 8,3% (v/v) d'extrait aqueux, et une teneur de 8 % en volume d'agent émulsifiant.

La biocompatibilité de la formulation finale peut s'appuyer sur plusieurs éléments :

- L'ingrédient naturel (extrait aqueux d'*Ulva lactuca*) est déjà répertorié dans la base INCI en tant qu'ingrédient non réglementé, car sans risque pour la santé humaine et d'impact environnemental réduit.
- Les ulvanes sont déclarées cytocompatibles par une étude de cytotoxicité *in vitro*, pour être utilisées pour des applications liées à la santé [257].

- L'ingrédient biosourcé (agent émulsifiant) est dérivé de l'acide *trans*-aconitique qui est répertorié dans la base GRAS (generally recognized as safe). Ainsi, l'acide *trans*-aconitique est déjà répertorié comme additif alimentaire (exhausteur de goût et co-additif anti-oxydant). Lors de la synthèse de l'agent émulsifiant, des traces d'acide aconitique n'ayant pas réagi sont en effet détectables par HPLC.
- Les aconitates d'alkyle peuvent être considérés comme des composés biocompatibles. D'une part, des monoesters, diesters and triesters préparés à partir d'éthanol, n-butanol et n-octanol ont été identifiés comme des composés prometteurs pour la préparation de nouveaux médicaments pour limiter les processus inflammatoires (de Oliveira, 2018). D'autre part, une étude viabilité cellulaire réalisée par l'INSERM a montré que l'acide *trans*-aconitique n'est pas toxique à une concentration de 10 mM et que l'aconitate de tridodécyle à 0,1 mM présente une viabilité cellulaire de 50 %. Ce pourcentage augmente avec des aconitates à chaîne plus courte [258].
De plus, les aconitates sont facilement hydrolysables en acide aconitique et en alcool correspondant.

Ces différentes informations excluent les phrases de risques interdites pour les produits de biocontrôle selon le décret de la DGAL paru en 2019, ce qui tend vers l'autorisation les formulations décrites pour un contact avec les agrumes, sans danger pour l'homme.

En conclusion, ces formulations écoresponsables représentent une approche intéressante pour améliorer l'efficacité de la conservation des agrumes. Les résultats de cette étude démontrent la faisabilité de la conception d'émulsions aux propriétés antifongiques à base d'ingrédients naturels et biosourcés.

La totalité des résultats est présentée sous la forme d'un article soumis à *Crop Protection*.

Green seaweed extract formulated with biobased ingredients for postharvest citrus fruit preservation

Douaa Salim ^{a,b}, Pascale de Caro ^a, Asma Chbani ^b, Xavier Chasseray ^c and Alain Shum Cheong Sing ^c

^aLaboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France

^b Laboratoire de Technologie appliquée, centre AZM pour la recherche en Biotechnologie et ses applications, Université Libanaise, Tripoli, Liban.

^cLaboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, LCSNSA, Université de La Réunion, Saint Denis, La Réunion, France

*Correspondence: pascale.decaro@ensiacet.fr; Tel: +33534323505

Abstract

Penicillium digitatum is the causal agent for citrus green mold which generates 90 % of post-harvest losses. The use of a green seaweed extract to struggle against this fungal pathogen could represent an alternative to chemical fungicides. We propose to formulate this aqueous extract in an emulsion dedicated to prevent the development of fungi on the citrus fruit. Biobased emulsifiers were selected to prepare emulsions combining hydrophilic natural active molecules and a vegetable oil used to disperse this aqueous phase, while forming a coating film after the water evaporation. Alkyl aconitates were synthesized from aconitic acid, a platform molecule coming from sugar cane, according to a green process. Alkyl aconitates were efficient to stabilize oil-in-water emulsions including the *Ulva lactuca* aqueous extract. *In vitro* and *in vivo* microbiological tests based on the fungus viability were carried out to evaluate the new ingredients towards the spore adhesion and the *Penicillium digitatum* germination. The results showed that anti-fungal activity of the *Ulva lactuca* aqueous extract formulated with alkyl aconitates was enhanced. Alkyl aconitates were able to confer a stability and a viscosity adapted to an easy application. These eco-compatible formulations represent an interesting approach to improve the efficiency of citrus fruit preservation.

Keywords: *Ulva lactuca* extract, biobased emulsifier, anti-fungal activity, green formulation, citrus fruit preservation

1. Introduction

Citrus fruit are heavily affected by *Penicillium digitatum*, which causes green mold diseases during the packaging, storage rooms, transit containers and market places. Plant diseases can be controlled by applying synthetic fungicides, but it may have several side effects, including the resistivity of strains, environmental contamination and human health issues. Therefore, an

alternative postharvest control, based on the use of natural ingredients could be safer for food industry and their consumers. In a previous work, Salim et al. (2019) obtained an *Ulva lactuca* aqueous extract rich in ulvan, proteins, polysaccharides and antioxidant molecules, and exhibiting an antifungal activity against *Penicillium digitatum*. The use of an aqueous plant extract to be applied on the peels requires a few precautions. For instance, moisture on fruit peels must be dried before transportation. Moreover, the spray of an aqueous extract generates rebound of the droplets on the surface, leaching and finally losses of part of the product, Therefore, we investigated another type of formulation based on an oil-in-water emulsion including the aqueous extract. An emulsion has a higher viscosity which can limit the running of product on the peel surface, and promotes its adherence. The dispersion of vegetable oil in the aqueous extract is expected to vehicle antifungal molecules of green seaweed towards the fruit peels.

The current paper deals with the feasibility to formulate an aqueous extract from *Ulva lactuca* under the form of an emulsion to improve the product application and the anti-fungal properties.

Extracts of green seaweed formulated with a biobased emulsifier have never been reported. A few examples of emulsions dedicated to the plant or fruit protection are reported. When an essential oil is the active composition, due to the low water solubility, it can be encapsulated in an oily phase which is dispersed in water with an emulsifier such as tween-20 or triton-X100 (Ali et al. 2017; Wu et al. 2019). When essential oils were encapsulated in nanoemulsions formulated with tween 80 and sunflower oil as a ripening inhibitor, the inhibiting effect against *A. niger* mycelial growth and spore germination was enhanced (Ribes et al. 2017).

Clausse et al. (2018) prepared an invert emulsion encapsulating polysaccharides to improve the efficiency of spraying on leaves. Lecithin and polyglycerol polyricinoleate were used as surfactants. Batta (2004) formulated conidia of *Trichoderma harzianum* in water-in-oil emulsions with Tween 20 to inhibit apple bleu mold.

To stabilize an emulsion including an aqueous seaweeds extract, biobased molecules has been selected. Their easy preparation from a platform molecule and their potential properties towards plants protection guided our choice. The platform molecule is aconitic acid, a tricarboxylic acid, which has a similar structure as itaconic acid, one of the twelve biobased building blocks molecules mentioned in a report of US Department of Energy (2004). Produced by plants during the Krebs cycle, aconitic acid is accumulated by some of them. It was first isolated by Peschier in 1820 in

Aconitum paniculatum and later was identified in sugar cane molasses in 1877 (Behr, 1877). It is the dominant acid in sugar cane juice (Yoder, 1911). If the isomer *cis*-aconitic acid is an intermediate of the citric acid cycle, the *trans*-aconitic acid is a defense metabolite in plant; it corresponds to the isomer form available when extracted.

Trans-aconitic acid (tAcoA) was also produced by dehydration of citric acid (Cranston, 1955). Properties which was identified for *trans*-aconitic acid are mainly the inhibition of enzymatic activity to treat some diseases (Chen et al., 2017) or its scavenging ability (Piang-Siong et al., 2017).

A few authors investigated the conversion of aconitic acid into esters. In 1949, an American patent mentioned the preparation of trialkyl aconitate using para-toluene sulfonic as catalyst and an azeotropic distillation of water (Meincke 1949). This patent claims outstanding properties of several trialkyl aconitates such as trilauryl or tributyl aconitate as active substances to protect materials from insect, fungi and bacteria.

More recently, several conditions have been studied to prepare isoamyl aconitate esters (Piang-Siong et al., 2011). The authors observed that the production of aconitates and their resulting compositions in monoesters, diesters and triester, strongly depend on the type of catalyst (homogeneous or heterogeneous). Fischer esterification with a mineral acid was also carried out to prepare ethyl, butyl and octyl aconitates by de Oliveira et al. (2018). This study has identified an anti-inflammatory activity in particular for dialkyl aconitates.

We can mention that biodegradable and non-toxic surfactants were prepared from citric acid, another tricarboxylic acid, through an esterification by polyoxyalkylated alcohols between 150 and 190°C (Turchiniet al., 1986). The resulting esters were used as a major component in shampoo formulations. Triesters of citric acid were also obtained with high aliphatic alcohols after 20 h reaction at 150°C (Grigoryan et al., 2017). These high purity esters were used as dietary substitutes for edible oils and fats. We can add that several esters of natural acids are cited for their anti-fungal activities. For instance, 5-O-caffeoyl quinic acid and some of its alkyl esters inhibited growth of *Aspergillii* which may contaminate food crops (Suárez-Quiroz et al., 2013). Milewska et al. (2012) also observed an inhibited growth of some human pathogenic yeasts by trimethyl *trans*-homoaconitate.

The present work aims to prepare an alternative formulation including natural and biobased ingredients, to replace the conventional synthetic pesticides, which are used to struggle against the fungal pathogen which grows on oranges peels.

The synthesis of aconitates from *trans* aconitic acid was performed by abiding with green chemistry principles. The reaction was shifted towards the ester category which is the most adapted to form an oil-in-water emulsion. *In vitro* and *in vivo* antifungal properties against *Penicillium digitatum* were investigated for the new ingredients and their resulting emulsions.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Lebanese *Ulva lactuca* (Leb UL) was freshly and manually collected from a coastal zone of the Mediterranean, El Mina (34 ° 26 'N–35 ° 50' E) in Tripoli, Lebanon, on 1 May 2017. The algae were cleaned with seawater to remove unwanted impurities, then cleaned three times with distilled water and dried at room temperature until the mass remained constant. The samples were then stored hermetically at room temperature.

Milli-Q water (PURELAB classic) was used in all work. *Trans*-aconitic acid (AcoA) (98%), oleyl alcohol (98%), dodecyl alcohol (DDA), Ethanol, sulfuric acid (95-98%), Nystatin Suspension, ampicillin sodium salt, streptomycin sulfate salt, Potato Dextrose Broth, Malt Extract agar were purchased from Sigma–Aldrich and molecular sieves 3A (4 to 8 mesh) was purchased from ACROS organics.

2.2. Synthesis of aconitate esters.

2.2.1. Synthesis of monododecyl and didodecyl aconitates under catalyst free conditions

Dodecanol (16.06 g, 86.2 mmoles) and aconitic acid (7.51 g, 43.1 mmol) corresponding to a ratio 2:1 were mixed in a 100 mL flask and heated under stirring until the solubilization of the solid aconitic acid. Five grams of molecular sieve were placed at the bottom of the cooler in a sintered glass fitting. The reaction medium was stirred at 170 °C during 2 h to get 28 g of a composition rich in monododecyl and didodecyl aconitates (70%).

^1H of monododecyl and didodecyl aconitates (CDCl_3): ^1H NMR: δ 7.03-6.93 ppm (s, 1H, C=CH), 4.24–4.09 ppm (t, 2H, O–CH₂), 3.95 ppm (s, 2H, CH₂–CO– O), 1.67-1.61 ppm (m, 2H, O–CH₂–CH₂–CH₂–), 1.24 ppm (m, 2H, CH₂–CH₂–), and 0.88 ppm (t, 3H, CH₃).

2.2.2. Synthesis of tridodecyl aconitate under catalyst free conditions

Dodecanol (24.09 g, 129.3 mmol) and aconitic acid (7.51 g, 43.1 mmol) corresponding to a ratio 3:1 were mixed in a 100 mL flask and heated under stirring until the solubilization of the solid aconitic acid. 5 g of molecular sieve were placed at the bottom of the cooler on a sintered glass fitting. The reaction medium was stirred at 170 °C during 3h, to get 28 g of mainly tridodecyl aconitate (73%).

^1H NMR of tri-dodecyl aconitate (CDCl_3): ^1H NMR: δ 7.03-6.93 ppm (s, 1H, C=CH), 4.22–4.09 ppm (t, 2H, O–CH₂), 3.95 ppm (s, 2H, CH₂–CO– O), 1.26 ppm (m, 2H, CH₂–CH₂–) and 0.88 ppm (t, 3H, CH₃).

2.2.3. Synthesis of tridodecyl aconitate under homogeneous catalysis

Dodecanol (16.06 g, 86.2 mmoles) and aconitic acid (7.51 g, 43.1 mmoles) were mixed and heated under stirring until the solubilization of the solid aconitic acid and before adding 2.7 wt.% of sulfuric acid (relative to alcohol weight). The reaction was then stirred at 100 °C during 5h. At the end of the reaction, 20 mL of ethyl acetate was added to the reaction medium and the organic phase was washed three times with 10 mL of water. The organic phase was dried with sodium sulfate before ethyl acetate evaporation.

2.3. Purification of products

2.3.1. Thin layer chromatography (TLC):

The thin layer chromatography was carried out with silica gel 60 F254 plates on aluminum foil (Merck). The mixture of aconitate esters was dissolved in the eluent composed of cyclohexane / ethyl acetate (70/30), to which 1% acetic acid is added. The plates were observed under UV lamp at 254 nm or revealed with a solution of potassium permanganate.

R_f = 0.82 was found for tridodecyl aconitate, higher than other spots corresponding to monodiester and diesters.

2.3.2. Column chromatography:

Tridodecyl aconitate was separated from monododecyl and didodecyl aconitates on silica gel 60 opened columns (70-200 μm). The aconitates mixture was solubilized in a small amount of ethyl acetate to be deposited at the top of silica gel. On the basis of TLC analyses, the same eluent was used. Tridodecyl aconitate was first recovered, followed by the fraction of didodecyl and monododecyl aconitates.

2.4. Characterization of esters aconitates

2.4.1. NMR analysis

^1H NMR spectra were collected on a Bruker Avance 300 spectrometer with a 5 mm BBFO ATMA probe. Chemical shifts are reported as parts per million from tetramethylsilane with an absolute frequency 300.13 MHz.

The compositions of the final reactional media were calculated by ^1H NMR integrations. Integrations of the methyne proton ($-\text{CH}=\text{C}$) were used to calculate the molar percentage of esters: Positions of the methyne proton obtained for spectra in CDCl_3 :

- monododecyl aconitate: 7.00 ppm, 7.02 ppm (or 7.03 ppm), 7.06 ppm
- didodecyl aconitates: 6.95 ppm (or 6.96 ppm), 7.01 ppm
- tridodecyl aconitates: 6.93 ppm

For instance, the calculation of molar percentage of mono-alkyl aconitate is carried out with the following formula (I: integration of signals for the methyne proton).

$$\% \text{ monododecyl aconitate} = \frac{\sum I_{\text{monoester}}}{\sum I_{\text{monoester}} + I_{\text{diester}} + I_{\text{triester}}}$$

Moreover, integrations of the methylene group, CH_2 in α -OH position for lauryl (3.583 ppm) and oleyl alcohol (3.586 ppm) were used to calculate the unreacted percentage of alcohol according to the formula:

$$\% \text{ unreacted dodecanol} = \frac{I_{\text{CH}_2\text{-OH}}}{I_{\text{CH}_2\text{-OH}} + I_{\text{CH}_2\text{COOR}}} \times 100$$

$I_{\text{CH}_2\text{-COOR}}$: Integration of methylene group in α - COOR position (esterified alcohol)

$I_{\text{CH}_2\text{-OH}}$: Integration of methylene group in α - OH position (unreacted alcohol)

2.4.2. Fourier transform infra-red (FTIR) spectra

FTIR spectra of aconitate esters were acquired by using a spectrophotometer coupled with an ATR accessory (Spectrum100, Perkin-Elmer, USA). Each spectrum is the averaged values of 16 scans in transmittance mode from 4000 cm^{-1} to 600 cm^{-1} at are solution of 4 cm^{-1} . Each spectrum was baseline corrected and the absorbance was normalized between 0 and 1.

The bands at 1740 cm^{-1} and 1720 are assigned to C= O stretching of esters, the bands at 1167 cm^{-1} corresponds to C–O stretching and the one at 1654 cm^{-1} is due to C=C stretching.

2.4.3. Determination of surface tensions

Surface tension measurements were performed using a GBX 3S (Surface Science Studies) tensiometer. A platinum blade (Wilhelmy's blade) whose length is 1.955 cm and a thickness of 0.01 cm (a perimeter of 3.93 cm) was used. Solutions corresponding to critical micellar concentrations of aconitates were prepared. A mobile sample holder brings the liquid to be analyzed in contact with the blade which is suspended on a precision scale.

2.5. Aqueous extraction of *Ulva lactuca*

The aqueous extracts of *Ulva lactuca* was prepared according to Jiménez et al. (2011). Five grams of dried algae was placed in a 100 mL flask. A quantity of 100 mL of boiling Milli-Q water was added. The medium was stirred magnetically for one hour at room temperature. The extract was then filtered twice through a double layer of sterile muslin cloth and then cooled to room temperature. After filtration, water was evaporated under vacuum to provide a dry material. The extracts were stored at 4°C until analysis.

2.6. Emulsification process

To prepare 24 mL of emulsion, 2 mL of aqueous extract of *Ulva lactuca* obtained with the previous protocol, were dissolved in 12 mL of water. Then, 2 mL of aconitates were blended with 8 mL of rapeseed vegetable oil. This lipophilic phase was added to the aqueous phase, before emulsifying with an Ultra Turax (T25 digital, IKA) for 2 minutes at 18000 rpm. The total content of aconitates in the emulsion corresponds to 8.3 % (v:v).

The emulsion samples were prepared with the compositions rich in targeted aconitates:

TA/O/W/UL: emulsion including tridodecyl aconitate (TA) and *Ulva lactuca* aqueous extracts

MDA/O/W/UL: emulsion including mono/didodecyl aconitates (MDA) and *Ulva lactuca* aqueous extracts

Emulsions without *Ulva lactuca* extract were also prepared (in this case 14 mL of water have been added instead of 12 mL).

TA/O/W: emulsion stabilized by tridodecyl aconitate (TA)

MDA/O/W: emulsion stabilized by monododecyl and didodecyl aconitates (MDA)

2.7. Stability of oil/water emulsion by creaming index

The emulsions stability was assessed by the determination of the creaming index (CI). Freshly prepared emulsions (20 g) were transferred into transparent glass tubes (27 mm internal diameter, 45 mm height) sealed by plastic caps. The tubes were kept at room temperature (25°C) for 7 days. The total heights of the emulsions in the tubes (H_T) were noted. The emulsions stability was followed by measuring the height of the transparent serum layer (H_S) formed below the opaque “cream” layer, at regular intervals. The creaming index (CI) was then calculated with the following formula:

$$CI (\%) = \frac{H_s}{H_t} \times 100$$

2.8. Viscosity measurements

A rheometer MCR 302 (Anton Paar) with a cone-plate geometry of 50 mm diameter and 2 ° angle was used to perform rheological analysis of the emulsions. Experiments were carried out at a

temperature of 25 °C regulated with a bath thermostat (Huber). The viscosity and shear stress were studied by increasing exponentially the shear strain from 0 to 50 s⁻¹.

2.9. Assessment of *in vitro* anti-fungal activity of the formulation

2.9.1. Preparation of pathogen inoculum

Protocol was adapted from Nicosia et al. (2016). Fungal isolates of *Penicillium digitatum* were obtained from infected oranges and then cultivated on Malt Extract Agar (MEA, Sigma–Aldrich) in order to obtain single conidia colonies. The variation in colony morphology from one species to another on a particular medium provides useful characteristics for the identification of isolates. For inoculum growth, cultures were kept at 22 °C for 7–10 days. Then, individual mold species with green color were isolated macroscopically. The colony morphology and their appearance were confirmed under the optical microscope. To prepare the spore solution, spores were collected using a sterile spatula, diluted in sterile distilled water, and then vortexed for 1 min to ensure uniform mixing. Spore concentration was fixed to 10⁸ C mL⁻¹ using a densitometer (Biosan DEN-1B, McFarland densitometer). The obtained stock solution (10⁸ C mL⁻¹) was then diluted to two solutions; S1= 10⁶ C mL⁻¹ was used for the study of extract effects on spore germination in liquid medium and on germ tube elongation, and S2= 2x10³ C mL⁻¹ was used to study the extract effects on fungus viability in solid medium.

2.9.2. Fungus viability

In order to evaluate the effects of the new ingredients on pathogen viability, 0.5 mL of solution S2 (2x10³ C mL⁻¹) was transferred to Eppendorf tubes containing 0.5 mL of aqueous extracts of *Ulva lactuca* and/or 0.5 mL of esters aconitates. Sterile ultrapure water and Nystatin were respectively used as negative and positive controls. Tubes were gently mixed and then incubated for 20 hours at 22 °C. Afterwards, the tubes were mixed and 100 µL of each mixture was spread on MEA culture medium containing ampicillin and streptomycin. Finally, cultures were incubated at 25 °C and the number of colony-forming units (CFU) was counted after 3–4 days.

The CFU percentage of each tested extract was then calculated by comparing it with water, used as a negative control.

2.9.3. Spore adhesion test

The orange cells were directly taken from a healthy orange by scratching its outer peel. These cells were then washed in Phosphate Buffer Saline (PBS) (1 mL/tube), centrifuged at 2500 g for 10 minutes, and finally re-suspended in 1 mL PBS for counting. *Penicillium digitatum* spores were taken from an infected orange and cultivated on Malt medium for 4 days at room temperature. Spores were then suspended in PBS. Spores and oranges cells' concentrations were evaluated using a densitometer (Biosan DEN-1B, McFarland densitometer). The solutions' concentration was estimated at 10^5 C mL⁻¹ for the orange solution and 10^7 C mL⁻¹ for *Penicillium digitatum*. Then, 1 mL of orange cell suspension was brought into contact with 1 mL of *Ulva lactuca* aqueous extracts and/or 1 mL of aconitane esters for 1 h, while stirring at room temperature on a rotary shaker. After 1 h of incubation, 1 mL of *Penicillium digitatum* spores was added to the various mixtures, and the whole mixture was stirred for 2 h at room temperature. After 2 h of incubation, the preparation was washed 3 times in PBS; for a clean wash, 0.5 mL of PBS solution was added each time and the mixture was centrifuged at 2500 g for 10 minutes. The aim of these centrifugations was to eliminate the remaining free spores. With the cells being in suspension, the test reading was carried out by the examination of fresh pellets reconstituted in 0.1 mL PBS. The adhesion index is defined as the number of *Penicillium digitatum* spores fixed per orange cell. An index greater than 25 is an indicator of a strong adhesion, whereas, for an index of less than 10, the adhesion is low (Linás, 1986). Ten orange cells were examined in triplicate for each extract and the averages of adherent cells were calculated.

2.9.4. Spore germination and germ tube elongation

An amount of 12.5 µL of the solution S1 (10^6 C mL⁻¹) was transferred to Eppendorf tubes, to which are added 25 µL of *Ulva lactuca* aqueous extracts and/or 25 µL of aconitane esters, as well as 12.5 µL of potato dextrose broth (PDB, Sigma–Aldrich). Sterile ultrapure water and Nystatin were respectively used as negative and positive controls. The tubes were then mixed and incubated for 20 hours at 22 °C, followed by a vortex in order to affect their homogenization. Afterwards, 2 µL of spore suspension was transferred to microscope slides, mixed with 2 µL of Lactophenol blue, and then observed at a magnification of 40 for spore germination and tube elongation. For each slide, three observations were performed, haphazardly.

2.10. *in vitro* antifungal activity of formulated ingredients

The determination of the antifungal properties of the new ingredients against *Penicillium digitatum* was carried out by a Disk diffusion test on Malt Extract agar (Sigma Aldrich), previously inoculated by flooding with *P. digitatum*. The microorganisms were grown on malt extract agar (Sigma Aldrich) plates at 24 °C for 48 hours prior to seeding into malt extract agar (Sigma Aldrich). One or several colonies of a similar morphology of each *P. digitatum* were transferred into the sterile distilled water and adjusted to the 0.5 McFarland turbidity standards (10^7 C mL⁻¹ suspension). Inoculates of the *P. digitatum* were seeded on Malt Extract agar. The sterile discs were impregnated with 25 µL/disc of the formulated ingredients and then dried. The sterile filter discs, 6.4 mm in diameter, were placed on inoculated agar medium and incubated at 24 °C for 48 hours. Nystatin (100 U/disc) was used as a positive antifungal control. The results were determined from the presence or absence of growth and the size of the inhibition zone. The diameter (mm) of the growth inhibition halos caused by the different extracts was measured. All the assays were carried out in triplicate.

2.11. *in vivo* protective test using formulated ingredients against *P. digitatum* infection

To examine whether the emulsions have inhibitory effects against *P. digitatum*, oranges were treated with these extracts and then infected with *P. digitatum*. First, the oranges were dried and then deposited on plastic plates containing absorbent paper, which was soaked with sterile distilled water in order to provide a moisture content of 95-100%. Each orange was then pulverized with 4 mL of emulsion or aqueous extract. Three oranges were used for each emulsion. The chemical fungicide Nystatin was used as a positive control and distilled water as a negative control (Chbani et al. 2013). Two hours after the pulverization, oranges were infected with *P. digitatum* by spreading 10 µL of spore suspension (10^5 spores/mL suspension) on their surface. The spore suspension was prepared by scraping the surface of PDA in older cultures incubated for 6 days at room temperature using a sterile spatula. This suspension was put into a blender with a few drops of Tween 20 (used as a solubilizing agent for membrane proteins) and then transferred to a spray device producing very fine droplets. Treated oranges were covered with a transparent film and stored at room temperature. 5 to 6 days after inoculation, the macroscopic aspects of the oranges were studied (Jiménez et al. 2011).

Statistical analysis

Analyses were done in triplicate using three microscope slides as well as three MEA plates. Data were statistically analyzed using ordinary one-way ANOVA with multiple comparison analysis; means were compared to negative control and the criterion of the significance of the treatment was $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.001$.

3. Results and discussion

The selectivity of the reaction was discussed according to several experimental parameters. Indeed, the emulsifying properties depends on the compositions in aconitates in the final medium.

3.1. Synthesis of *mono- and di- alkyl aconitates*

To produce preferentially mono- and di-alkyl aconitates, aconitic acid (AcoA) reacted with dodecanol and oleyl alcohols according to a 2:1 ratio, allowing the solubilization of AcoA when heating. Moreover, this ratio is a good compromise between AcoA conversion and the content in mono- and di- alkyl aconitates in the final medium. In table 1, the compositions in esters produced by the catalyst free reaction are given in relative molar percentages. In table 2, are indicated the percentages including the unreacted alcohol in the final medium.

3.1.1. Effect of hydrocarbon chain length of alcohol.

The comparison of experiments 1 and 2 (Table 1) showed that the content of mono- and di-esters was higher for the reaction with dodecanol, compared to oleyl alcohol; It is in agreement with the higher proportion of unreacted dodecanol compared to oleyl alcohol.

Thus, oleyl alcohol had a slightly better reactivity than dodecanol towards aconitic acid (Table 2). In fact, for a solvent free reaction, the viscosity of reactional medium has an influence on the reaction course. The fluidity of oleyl alcohol probably improved the diffusion of aconitic acid in the medium. The lower reactivity of dodecanol logically limited the conversion of monododecyl and didodecyl aconitates into tridodecyl aconitate, that was favorable to enrich the medium in these species.

3.1.2. Effect of time

Experiments 1 and 3 (Table 1) showed that an extended reaction time to 3 h tended to improve the conversion of dodecanol and to increase the proportion of tridodecyl aconitate. Thus, by limiting the reaction time at 2 h, the highest content of monoester and diester (70.6%) is reached (Table 2).

Experiments	Time	alcohol	% monoester and diesters	% monoester	% diester	% triester
1	2h	Dodecyl	70,6%	37,9%	32,7%	29,4%
2		Oleyl	63,8 %	34,4 %	29,4 %	36,2 %
3	3h	Dodecyl	62,5 %	29,5 %	33,0%	37,5%

After reaction, the contents in unreacted alcohol were evaluated in the media (Table 2).

Experiments	% unreacted alcohol	% monoester and diester	% triester
1	21,9 %	55,1 %	23,0 %
2	26,7 %	46,7 %	26,5 %
3	26,8 %	45,8 %	27,3 %

The experiment 1 which led to the highest contents of mono- and di-alkyl aconitates (70.6%) was kept to prepare emulsions.

3.2. Synthesis of *tri-alkyl* aconitates

The ratio dodecanol: AcoA was increased to enhance trialkyl aconitate formation. The results are presented in table 3 including relative compositions in esters. In table 4 are also presented the contents in unreacted alcohol.

3.2.1. Effect of Time

For catalyst free conditions (experiments 4 and 5), the effect of time from 2 to 3 h acted positively on the production of tridodecyl ester, its proportion in the medium shifting from 66% to 73 %.

3.2.2. Effect of catalyst

Homogeneous catalysis requires a lower temperature (100°C) but a longer reaction time (5 h), compared to catalyst free reaction conditions, to obtain at least 60 % of triester in the final medium. Experiment 6 shows that after 5 h, it was not possible to reach the percentage of triester obtained without catalyst (73%).

Table 3: Production of tridodecyl aconitate with dodecanol: AcoA ratio = 3:1 (from NMR data)

Experiments	Catalysis	Temperature	Time (h)	% monoester	% diester	% triester
4	-	170°C	2	20.6 %	13.2 %	66,1 %
5	-	170°C	3	0,9 %	25,6 %	73,5%
6	Homogeneous	100°C	5	28%	12%	60 %

The conversion of dodecanol calculated for homogeneous catalyst (exp.6) was lower than for experiment 4.

Table 4: composition of the final medium after esterification (from NMR data)

Experiments	% of unreacted dodecanol	%monoester and diester	% triester
4	34,2 %	22,3 %	43,5 %
5	30,2 %	18,4%	51,3 %
6	45.2 %	21.9 %	32.8 %

The experiment 5 which had the highest content in tridodecyl aconitate (73.5%) was selected to prepare emulsions.

Finally, dodecyl and oleyl aconitates were easily synthesized through a solvent free reaction, without adding a catalyst, avoiding thus a purification step. The conditions allow to reach a selectivity above 70% for the target aconitates, after 2 or 3 hours of reaction.

3.3. Characterization of emulsifying properties

Calculations of lipophilic-hydrophilic balance (HLB) of the different aconitates were performed with Griffin method using the following formula:

$$HLB = 20 * [(M_H / (M_H + M_L))]$$

with M_H et M_L being the weights of hydrophilic and lipophilic parts in the molecule

For a mixture of several molecules, we can use: $HLB = \sum x_i * HLB_i$ with x_i the molar fraction of the molecule i in the mixture (Table 8).

Ethoxylated sorbitan monooleate is a marketed surfactant chosen as a standard. It is used as a hydrophilic emulsifier or as a stabilizing agent for emulsions in the pharmaceutical, cosmetic, textile or lubricant industries.

Monoisoamyl aconitate	14
Monododecyl aconitate	8.5
Didodecyl aconitate	6,1
Tridodecyl aconitate	4.9
Experiment 1 (70.6% mono/didodecyl aconitate)	6,65
Experiment 4 (66% tridodecyl aconitate)	5,8
Experiment 5 (73.6% tridodecyl aconitate)	5.2
Experiment 4 including unreacted dodecanol	8.6
Experiment 5 including unreacted dodecanol	7,8
Dodecanol	14
Ethoxylated monooleate sorbitan	16,5

Due to the polar head of carboxylic acid, HLB of monododecyl or didodecyl aconitates are logically higher than the one of tridodecyl aconitate. HLB of monoalkyl aconitates are the most adapted to stabilize an oil-in-water emulsion ($HLB > 8$). So, the medium rich in mono/didodecyl aconitates may be suitable to prepare the targeted emulsion. The possible presence of dodecanol in the medium tended to increase the HLB which was interesting for the preparation of oil-in-water emulsions.

The surface tensions of monoesters and diesters of aconitates isolated by silica gel column were measured at their critical micellar concentration (CMC). The measurements were not performed with tridodecyl aconitate due to its poor solubility in water.

Table 9: Characterization of emulsifying agents		
Surface tension ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) at 25°C		CMC ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Mono/diisoamyl aconitate *	36	$31\cdot 10^{-2}$
Mono/didodecyl aconitates (exp. 5)	22	$12\cdot 10^{-2}$
Ethoxylated monooleate sorbitan (Reference)	40	$5\cdot 10^{-2}$

* synthesis according to W. Piang-Siong et al.

Table 9 shows that mono/didodecyl aconitate added to water can lower its surface tension ($72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ at 20°C), as does the standard surfactant. Mono/didodecyl aconitates have the ability to form micellar, in particular those with a twelve-carbon chain. The structures of mono/didodecyl aconitates present polar moieties (free aconitic acid groups), which confer amphiphilic structures to the molecules. This result confirmed that the mixture rich in monododecyl and didodecyl aconitates had good emulsifying properties

The creaming indexes of emulsions based on new ingredients were measured during 6 days. Oil-in-water blends stabilized with aconitates were compared with oil-in-water blends including both aconitates and *Ulva lactuca* aqueous extracts.

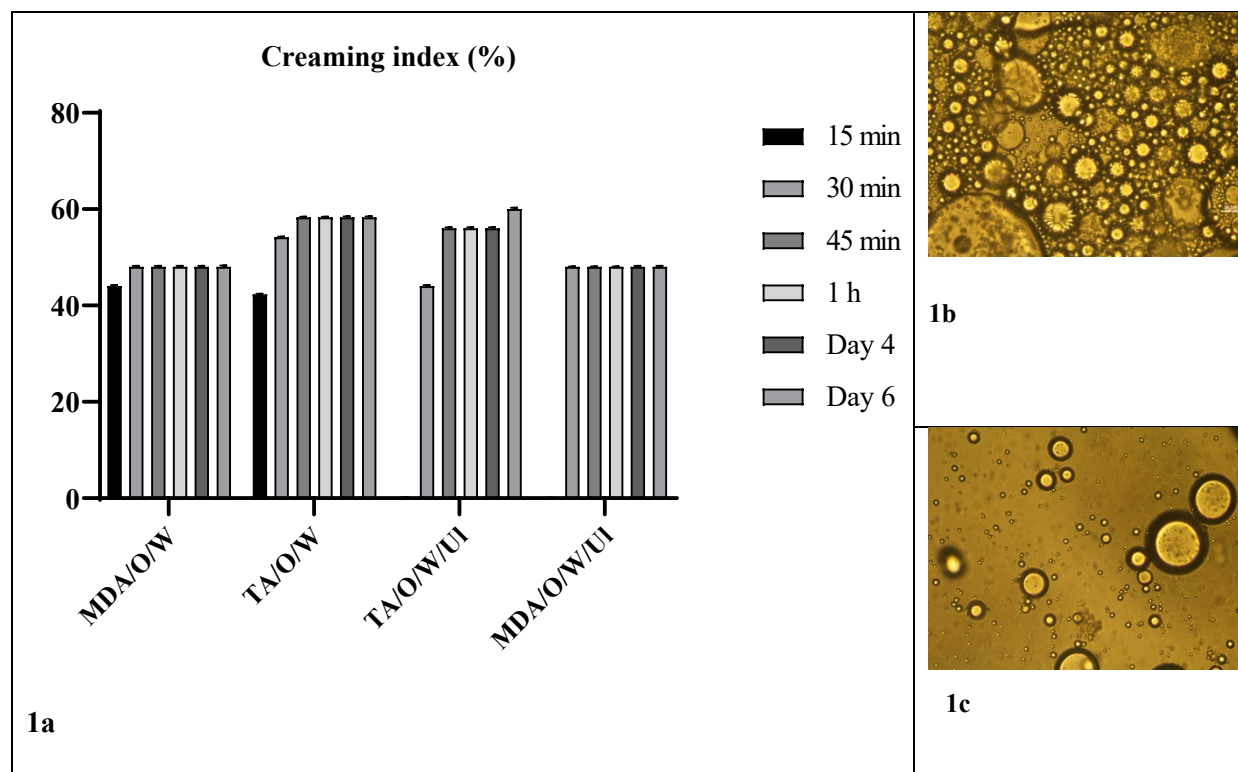


Figure 1a: Creaming index profiles CI (%) of emulsions stored at room temperature for 6 days. (MDA: mono/dodecyl aconitates, TA: tridodecyl aconitate, UI: *Ulva lactuca* aqueous extract), **1b:** Micrograph (x 40) of fresh emulsion with MDA, **1c:** Micrograph (x 40) of fresh emulsion with TA

In agreement with their physico-chemical characteristics, monododecyl and didodecyl aconitates led to more stable emulsions (lower creaming index) than those stabilized with tridodecyl aconitate. The fresh emulsion prepared with MDA had a milky aspect due to a thinner dispersion of oil in the aqueous phase, which is in agreement with the size of oil droplets observed on the micrographes (Figure 1b and 1c). In any case, creaming index was almost stable during the 6 days period, which lets enough time to use the emulsion after its on-site preparation. Moreover, the stability of emulsions was preserved when the *Ulva lactuca* aqueous extract was used.

3.4. Viscosity of emulsions

The viscosities of emulsions prepared with new ingredients were measured (Table 5). Emulsions including aconitates had similar viscosity values around 7,6 mPa.s. When emulsions included both aconitates and UI. aqueous extracts, their viscosity increased above 15 mPa.s which is interesting for the product adhesion to fruit peels.

Table 5: Apparent viscosities of emulsions at a shear = 20 s ⁻¹				
Ingredients in the emulsion	Mono/didodecyl aconitates from exp. 1	Tridodecyl aconitate from exp.5	Exp.1 + Ul aqueous extract	Exp.5 + Ul aqueous extract
Viscosity (mPa.s)	7.5	7.7	15;9	19.7

3.5. Effect of formulated ingredients on fungus viability, spore adhesion and germination.

Anti-fungal activities of the new ingredients and their emulsions were tested according to three approaches: effect on fungus viability, effects on spore adhesion and on spore germination *Penicillium digitatum*.

3.5.1. Effects of new ingredients on fungus viability.

After being incubated at 25 °C for 3–4 days, the number of colonies forming units (CFU) was recorded for the different samples.

Figure 2 showed the results of the antifungal inhibition cultivated on dishes after 4 days incubation. We observe that *Ulva lactuca* extract has a CFU = 4, corresponding to anti-fungal properties. The emulsifier agent (mixture of monododecyl and didodecyl aconitates) inhibited the appearance of colonies with CFU=1 more than tridodecyl aconitate (CFU=9). In fact, anti-fungal activity for the synthesized aconitates are in agreement with the application described by Meincke (1949).

The association of the two combined ingredients (*Ulva lactuca* extract and aconitates) leads to a strong antifungal activity against *Penicillium digitatum* as the resulting emulsions exhibits a CFU value equal to 0. So, the combination of extract and emulsifier allows an effective decrease of CFU.

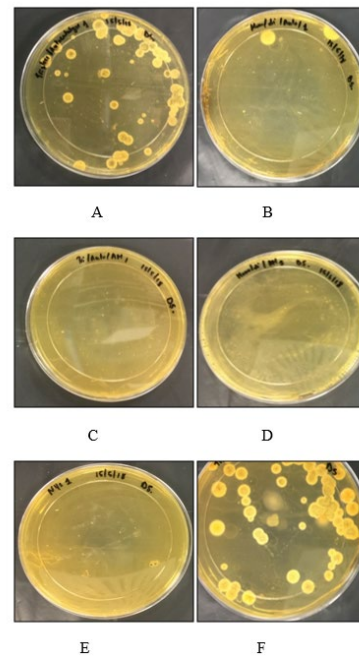
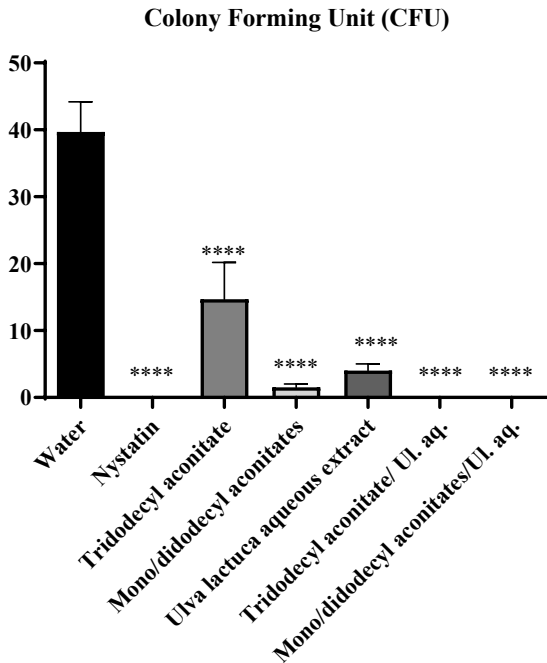


Figure 2: CFU of fungal pathogen on MEA medium incubated for four days with the new ingredients. each value is a mean \pm SD of triplicate; Values were compared to negative control (water) and the criterion of the significance of the treatment was $*P < 0.05$, $****P < 0.001$. A) tridodecyl aconitate; B) mono/didodecyl aconitates; C) mixture of tridodecyl aconitate and *Ulva lactuca* ; D) mixture of mono/didodecyl aconitates and *Ulva lactuca* ; E) Nystatin; F) Water.

3.5.2. Effects of new ingredients on the adhesion of spores on the epidermal orange cells.

The adhesion of *P. digitatum* spores to the epidermal cells of oranges has been assessed in the presence of the new ingredients (Figure 3). PBS was used a negative control (AI=32) and Nystatin (AI=0,7) was used a positive control. The index of adhesion for the different samples were lower than 10, which indicates a low spore adhesion according to Linas 1986. In fact, a decrease of spore adhesion was detected when *Ulva lactuca* aqueous extract and aconitates were tested separately. The mixtures of both materials (extract and aconitate) are also efficient to preserve the index adhesion below 10.

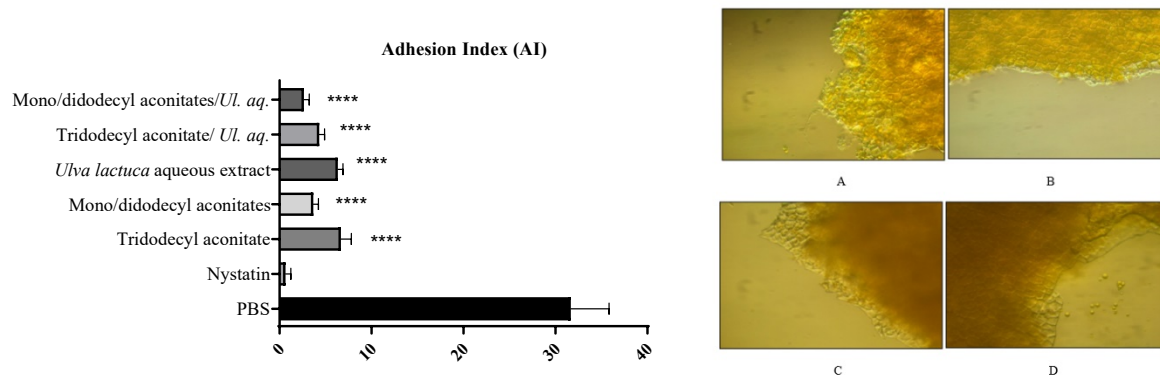


Figure 3: The adhesion index of *P. digitatum* to the orange's epidermal cells in the presence of *Ulva lactuca* extract and aconitates. each value is a mean \pm SD of triplicate; Values were compared to negative control (water) and the criterion of the significance of the treatment was * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$. A) tridodecyl aconitate; B) mono/didodecyl aconitates; C) mixture of tridodecyl aconitate and *Ulva lactuca*; D) mixture of mono/didodecyl aconitates and *Ulva lactuca*.

3.5.3. Effect of new ingredients on spore germination and germ tube elongation

For the samples including at least one of the new ingredients, inhibition of spore germination ranged between 78% and 87% compared with water as a negative control (0%) and nystatin as a fungicidal standard (100%) (Figure 4).

When tested separately, *Ulva lactuca* aqueous extract and aconitates have shown an activity for the inhibition of germination of *P. digitatum*. A similar activity was observed when the extract was associated to one of the aconitates,

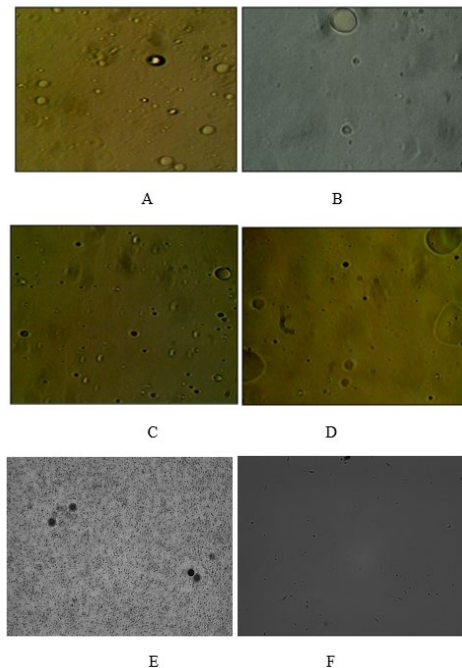
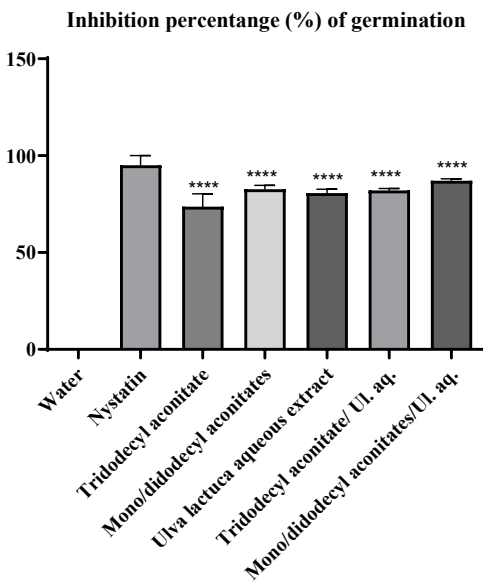


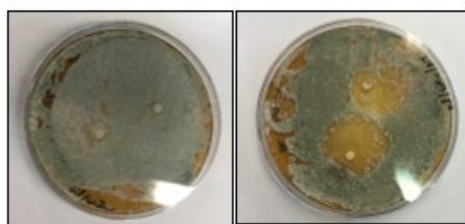
Figure 4: Inhibition percentage of the germination of *P. digitatum* incubated for 20 h at 22 °C in PDB containing *the new ingredients*, water as negative control and Nystatin as positive control, each value is a mean \pm SD of triplicate; Values were compared to negative control (water) and the criterion of the significance of the treatment was $*P < 0.05$, $****P < 0.001$. A) tridodecyl aconitate; B) mono/didodecyl aconitates; C) mixture of tridodecyl aconitate and *Ulva lactuca* aq. extract; D) mixture of mono/didodecyl aconitates and *Ulva lactuca* aq. extract; E) Water; F) Nystatin.

3.6. *in vitro* antifungal activity of new ingredients

Antifungal activities of the new formulations were assayed against one fungal strain *Penicillium digitatum* by evaluating the inhibition zone diameter (table 6 and figure 5). A zone diameter above 10 mm corresponds to the limit value defined by Drouhet and Dupont (1976) for the positive control (Nystatin). First, we can check that the aqueous extract of *Ulva lactuca* presented a higher anti-fungal activity than aconitates. The association of both of them led to high inhibition zone diameters (26-27 mm) similar to the one of *Ulva lactuca* aqueous extract. When Ul aq. extract was emulsified by mono/didodecyl aconitates, the resulting inhibition zone diameter was the highest (31 mm), meaning that this emulsion helps to increase the antifungal activity of UL aq. extract.

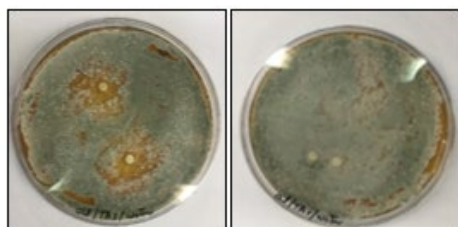
Table 6: Antifungal activities around the wells of *Ulva lactuca* extracts and aconitates (from exp. 1 and 5)
 - each value is a mean \pm SD of triplicate

<i>Penicillium digitatum</i>		Inhibition zone diameter (mm)
Control	Nystatine	25 \pm 0.5
	Water	0 \pm 0.0
	Oil / water	8 \pm 0.5
Aconitates	Tridodecyl aconitate	17 \pm 0.2
	Mono/didodecyl aconitates	13 \pm 0.2
Seaweed	Aqueous extracts <i>U. lactuca</i>	26 \pm 0.2
Mixture	Tridodecyl aconitate / <i>U. lactuca</i>	27.3 \pm 0.4
	Mono/didodecyl aconitate / <i>U. lactuca</i>	26.5 \pm 0.4
Emulsions	Tridodecyl aconitate /O/W	11 \pm 0.2
	Mono/didodecyl aconitates /O/W	28 \pm 0.2
	Tridodecyl aconitate / O/W/ <i>U. lactuca</i>	10 \pm 0.3
	Mono/didodecyl aconitates /O/W/ <i>U. lactuca</i>	31.4 \pm 0.3



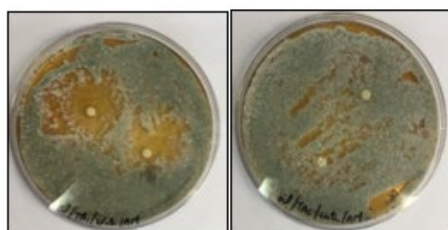
A

B



C

D



E

F

Figure 5: Antifungal activities of new ingredients assessed by the disc diffusion method; A) Oil-in-water; B) Ul. Aqueous extracts; C) Mono/didodecyl aconitates/O/W; D) Tridodecyl aconitate (exp.5)/O/W; E) Mono/didodecyl aconitates (exp.1)/O/W/ UI; F) Tridodecyl aconitate (exp.5)/O/W/UI.

3.8. *in vivo* protective test with formulated ingredients against *P. digitatum* infection

Oranges were infected by the *P. digitatum* two hours after the pulverization. During 45 days (from May 20 to July 1, 2019), the treated oranges were daily monitored and the percentages of non-infected oranges were recorded (figure 6).

Untreated oranges were not infected during four weeks, but reached a rate of infection of 88 % at the end of the 5th week. A few percent of oranges treated with the only aqueous extract solution started to be infected during the third week. Oranges treated with an emulsion showed lower infection rates: at the end of sixth week, 88.9 % of oranges treated with an aconitate based emulsion remained healthy with a normal external appearance, instead of 83% for the oranges treated only with the *Ulva lactuca* extract. Unlike the *in-vitro* tests, emulsions prepared from tridodecyl aconitate or from mono/didodecyl aconitates exhibited the same resistance towards *Penicillium digitatum*.

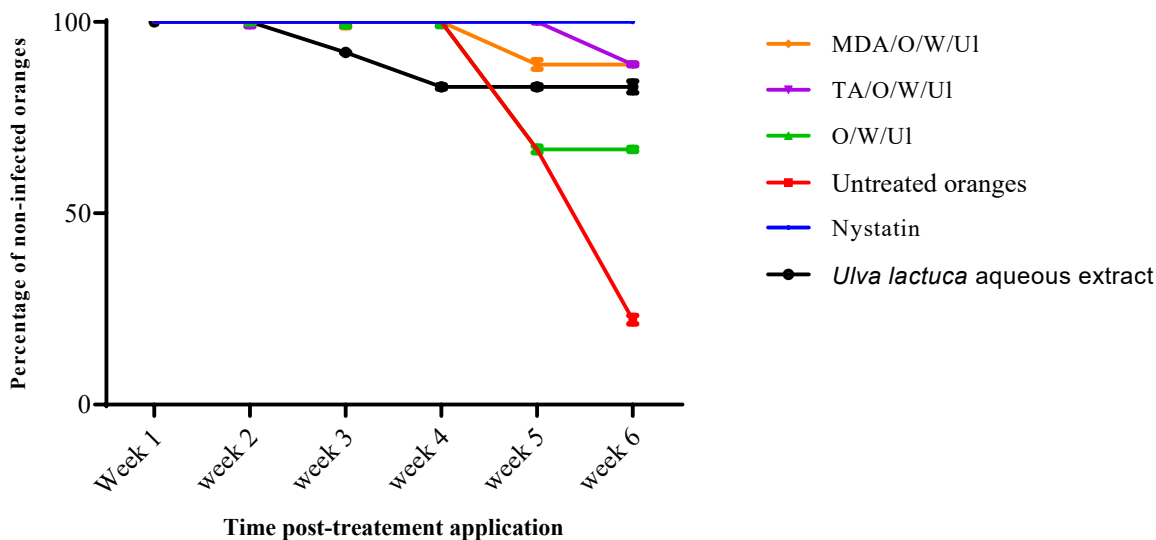


Figure 6: Percentage of non-infected oranges treated with the formulated ingredients MDA, Mono/didodecyl aconitates from experiment 1, TA: tridodecyl aconitate from experiment 5

The action of *Ulva lactuca* aqueous extract was observed from 4 weeks and a half (intersection between the black curve and the red curve). The aqueous extract took between two and three weeks before stabilizing the non-infected rate of oranges. From the fourth week, emulsions with TA et MDA reduced the infection rate more significantly than aqueous extracts, in particular with the tridodecyl aconitate based emulsion..

Conclusion:

Overall, this study showed the possibility to formulate an aqueous extract of *Ulva lactuca* with a biobased emulsifier, as a new formulation able to substitute to chemical fungicides. The combination of two ingredients (a natural extract and a biobased emulsifier) within an emulsion has several advantages; an easier application, a better adherence to orange peels, and a more rapid drying of the formulation are expected. The emulsions also contain only 8.3% (v:v) of aqueous extract, thus sparing a large amount of active molecules. Long chain aconitates obtained through a green route showed interesting emulsifying properties due to their amphiphilic structures. It was possible to modify the composition in aconitates by tuning the synthesis conditions. *In vitro* tests detected anti-fungal activities for both aconitates and *Ulva lactuca* aqueous extract. Moreover, the different tests highlighted that the emulsification of Ul. aqueous extract with 8 % (v:v) of aconitates improved its anti-fungal activity. The resulting emulsions based on natural and biobased ingredients were thus able to inhibit mycelia growth, and eliminate both spore germination and spore adhesion of *P. digitatum* on citrus fruit. *In vivo* tests confirmed that aconitates contributed to an anti-fungal action. Even if the two compositions of aconitates have not exactly the same emulsifying properties and anti-fungal activities, both of them generated functional and stable emulsions including the *Ulva lactuca* extract.

The results of this study provided guidelines for the design of antifungal emulsions based on natural and biobased ingredients. This finding represents a contribution towards the utilization of an ecofriendly formulation for controlling postharvest citrus fruit against *Penicillium digitatum*.

Acknowledgment

This work was funded by the Laboratories mentioned in the partnership. We thank AZM Center for Biotechnology in Tripoli (Lebanon) for the PhD grant.

References:

- Ali, E. O. M., Shakil, N. A., Rana, V. S., Sarkar, D. J., Majumder, S., Kaushik, P., Kumar, J., 2017. Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Industrial Crops and Products*.108, 379-387.
- Batta, Y. A., 2004. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum Rifai* formulated in an invert emulsion. *Crop Protection*. 23(1), 19-26.
- Behr, A., 1877. Über das Vorkommen von Aconitsäure im Zuckerrohrsaft und Colonialzucker. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 10(1), 351-355.
- Chbani, A., Mawlawi, H., Zaouk, L., 2013. Evaluation of brown seaweed (*Padina pavonica*) as biostimulant of plant growth and development. *African Journal of Agricultural Research*. 8(13), 1155-1165.
- Clausse, D., Lanoisellé, J. L., Pezron, I., Saleh, K., 2018. Formulation of a water-in-oil emulsion encapsulating polysaccharides to improve the efficiency of spraying of plant protection products. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 536, 96-103.
- Cranston, Hoy A., 1955. Manufacture of aconitic acid . Patent US 2727066A.
- de Oliveira, D. P., do Valle Moreira, T., Batista, N. V., de Souza Filho, J. D., Amaral, F. A., Teixeira, M. M., Braga, F. C., 2018. Esterification of *trans*-aconitic acid improves its anti-inflammatory activity in LPS-induced acute arthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, 87-95.
- Droubet, E. and Dupont, B., 1976. Traitements antifongiques. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, Chap.9: maladies infectieuses, 8004.
- Grigoryan, G. S., Grigoryan, Z. G., Malkhasyan, A. T., 2017. Obtaining Esters of Citric Acid with High Aliphatic Alcohols. *Chemistry and Biology*. 51(2), 88-91.
- Jiménez, E., Dorta, F., Medina, C., Ramírez, A., Ramírez, I., Peña-Cortés, H., 2011. Anti-phytopathogenic activities of macro-algae extracts. *Marine drugs*. 9(5), 739-756.
- Kimura, L. H., & Pearsall, N. N. (1978). Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Infection and Immunity*. 21(1), 64-68.
- Meincke, E.R., 1949. Method of pest control. Patent US 2475629.
- Milewska, M., Prokop, M., Gabriel, I., Wojciechowski, M., & Milewski, S., 2012. Antifungal activity of homoaconitate and homoisocitrate analogs. *Molecules*. 17(12), 14022-14036.
- Li Destri Nicosia, M. G., Pangallo, S., Raphael, G., Romeo, F. V., Strano, M. C., Rapisarda, P., Schena, L. (2016). Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biology and Technology*. 114, 54-61.
- Piang-Siong, W., de Caro, P., Lacaze-Dufaure, C., Shum Cheong Sing, A., Hoareau, W., 2012. Effect of catalytic conditions on the synthesis of new aconitate esters. *Industrial crops and products*. 35(1), 203-210.

- Piang-Siong, W., de Caro, P., Marvilliers, A., Chasseray, X., Payet, B., Shum Cheong Sing, A., Illien, B., 2017. Contribution of *trans*-aconitic acid to DPPH scavenging ability in different media. *Food chemistry*. 214, 447-452.
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., Barat, J. M., Ferrari, G., Donsi, F., 2017. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. *Food Control*. 73, 784-795.
- Salim, D., de Caro, P., Merah O., J., Chbani, A., 2019. Control of postharvest citrus green mold using *Ulva lactuca* extracts as a source of active substances *submitted to Horticulturae in october 2019*.
- Chen, S-T, Lee, I-S, Chen, Y-C., 2017. *Trans*-aconitic acid compounds are uses there of inhibiting phosphodiester. US 9610268 B2.
- Suárez-Quiroz, M. L., Campos, A. A., Alfaro, G. V., González-Ríos, O., Villeneuve, P., & Figueroa-Espinoza, M. C., 2013. Anti-*Aspergillus* activity of green coffee 5-O-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters. *Microbial pathogenesis*. 61, 51-56.
- Turchini, L., Garlisi, S., Albanini, A., 1986. Surfactants derived from citric acid. Patent EP 01991131 A2.
- Werpy, T., Petersen, G., 2004. Top value-added chemicals from biomass: volume I--results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas (No. DOE/GO-102004-1992). National Renewable Energy Lab., Golden, CO (US).
- Wu, D., Lu, J., Zhong, S., Schwarz, P., Chen, B., Rao, J., 2019. Effect of chitosan coatings on physical stability, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of lecithin stabilized cinnamon oil-in-water emulsions. *LWT-Food Science and Technology*. 106. 98-104.
- Yoder, P. A., 1911. Notes on the Determination of Acids in Sugar Cane Juice. *Industrial Engineering Chemistry*. 3(9), 640-646.

Conclusion générale et perspectives

La prise de conscience des impacts négatifs des traitements chimiques appliqués aux agrumes ont conduit à la recherche d'une solution alternative pour lutter contre les champignons responsables de la moisissure des agrumes. La nouvelle approche étudiée porte sur le développement d'un biopesticide à base d'extraits issus d'une macroalgue verte, l'*Ulva lactuca* (laitue de mer) que l'on trouve sur de nombreux territoires côtiers.

Tout d'abord, différents extraits ont été réalisés à partir de l'algue sèche. Trois lots ont été sélectionnés, un échantillon d'*Ulva lactuca* collectée sur la côte Libanaise et deux échantillons d'*Ulva lactuca* importés de Chine, correspondants à une qualité alimentaire et à une qualité agricole. La composition des extraits a été étudiée, soit dans leur globalité soit en isolant des fractions riches en chlorophylles ou en polysaccharides soufrés. Plusieurs solvants verts ont été privilégiés pour réaliser des macérations et obtenir des fractions de compositions différentes.

L'évaluation de leur activité antifongique *in vitro* et *in vivo* a été réalisée en mettant en œuvre plusieurs méthodologies.

Les extraits aqueux d'algues privilégiés ont été formulés selon deux méthodes :

D'une part la micro-encapsulation permet de préserver l'activité anti-fongique des extraits pendant le stockage et le transport, avant de les resolubiliser au moment de leur utilisation. D'autre part, l'incorporation des extraits dans une émulsion huile-dans-eau avait pour objectif de limiter la consommation en molécules actives et de faciliter l'adhérence de la formulation à la surface des agrumes.

L'étude des propriétés des extraits d'algues vertes *Ulva lactuca* ainsi que les formulations obtenues conduisent aux résultats suivants :

- Tous les extraits inhibent la germination des spores entre 70 et 87%, génèrent une inhibition totale (CFU=0) de la viabilité de *P. digitatum* et induisent une faible adhésion des spores sur les cellules épidermiques (indice d'adhésion (IA) <10). Les extraits et les fractions isolées (chlorophylles et ulvane) inhibent la croissance de *P. digitatum* avec des efficacités variables par rapport au contrôle (solvant de l'extrait). En effet, les extraits

hydrophiles comme les extraits lipophiles ont des propriétés anti-fongiques qui peuvent être exploitées pour le développement d'un biopesticide.

- L'activité antifongique *in vivo* des extraits aqueux d'*Ulva lactuca* a été évaluée par des tests à l'échelle laboratoire et l'échelle pilote. Nous avons démontré que la pulvérisation des extraits aqueux *Ulva lactuca* réduit de 75 à 80% le nombre d'oranges contaminées par l'apparition de la moisissure verte des oranges, et ce par rapport au témoin négatif traité à l'eau, après 45 jours de stockage à température ambiante. L'essai réalisé à plus grande échelle au centre Safadi pour l'emballage et l'exportation des fruits (Halba, Akkar, Liban) a montré que 90,5% du nombre d'oranges traitées par les extraits aqueux étaient non infectées par *P. digitatum* après 4 semaines de stockage.
- Les extraits testés (aqueux, éthanolique, et fractions chlorophylles) d'*U. lactuca* ont induit une augmentation transitoire des activités enzymatiques de β -1,3 glucanase et de peroxydase dans les tissus d'oranges, processus qui pourrait être à la base du mécanisme de défense contre le *Penicillium digitatum*. La quantification de la protéine pourrait constituer un outil utile pour la détection de l'activité anti-fongique potentielle d'une molécule ou d'une fraction extraite.
- L'isolat de protéine de soja s'est avéré le matériau d'enrobage le plus adapté pour préserver l'activité anti-fongique de l'extrait d'algue verte. De plus, cette matière première, après dissolution des capsules, semble renforcer l'activité anti-fongique initiale des extraits. La solubilisation des microparticules d'*Ulva lactuca* dans l'eau permettra d'obtenir une solution aqueuse prête à l'emploi ou bien pouvant être utilisée comme base pour la préparation d'une émulsion.
- Un agent émulsifiant biosourcé a été synthétisé selon un nouveau procédé vert. Des esters dérivés de l'acide aconitique ont montré leur capacité à stabiliser une émulsion huile-dans-eau en lien avec les HLB des esters. Des émulsions incorporant 8,3 % d'extrait aqueux et 8 % d'agent émulsifiant ont montré des propriétés anti-fongiques accrues comparées aux extraits aqueux seuls. Les tests *in vitro* ont révélé la capacité de ces émulsions pour inhiber l'apparition des moisissures. Ces résultats peuvent être attribués aux propriétés anti-fongiques détectées pour les aconitates synthétisés, propriétés jusqu'alors peu connues, qui renforcent les propriétés de l'extrait aqueux. La présence d'huile végétale agissant en

tant qu'agent filmogène peut également expliquer l'action favorable des émulsions pour lutter contre l'apparition du *P. digitatum*.

- La mise au point d'une émulsion associant des ingrédients biosourcés et d'origine naturelle, est une façon innovante de répondre aux cahiers des charges des biopesticides pour le traitement post-récolte des agrumes.

Les solutions alternatives que suggèrent les travaux réalisés ont pris en compte différents paramètres ;

- Les contraintes techniques en termes de propriétés physico-chimiques et microbiologiques ont conduit à optimiser l'efficacité des molécules fonctionnelles,
- Les impacts environnementaux sont minimisés par des procédés éocompatibles qui répondent clairement aux principes de la chimie verte,
- Les aspects sanitaires ont été intégrés puisque l'absence de toxicité des ingrédients utilisés s'appuient sur différentes données disponibles, et des formulations sans émission de COV ont été privilégiées,
- Les aspects économiques ont été pris en compte tout au long du travail : accent mis sur les extraits aqueux, coût de l'agent émulsifiant minimisé par une synthèse verte (sans ajout de tiers solvant, sans catalyseur et sans post-traitement) et une teneur réduite en molécules actives.
- Le contexte réglementaire auquel nous nous sommes référés permet à ce travail de répondre aux exigences d'une agriculture durable et d'une industrie agro-alimentaire générant des produits sains.

En perspective d'une future commercialisation, la compatibilité des formulations avec les exigences d'un contact alimentaire par une composition de biocontrôle devra être validée.

De plus, il serait intéressant de mettre au point une émulsion incorporant des extraits lipophiles riches en chlorophylle, de façon à comparer le niveau d'activité anti-fongique atteint par rapport à l'émulsion basée sur l'extrait aqueux.

Enfin, il est prévu de réaliser une étude de faisabilité pour produire et commercialiser une formulation aqueuse à base d'algue sur le marché libanais. Ce projet comporterait les étapes suivantes : sélection de fournisseurs d'algue, préparation des installations de production,

production d'échantillons, commercialisation du produit, amélioration continue du produit en se basant sur des analyses et sur les appréciations des clients.

L'obtention d'une homologation en tant que produit phytopharmaceutique sera nécessaire, avant d'envisager l'exportation du produit vers d'autres pays.

Références bibliographiques

- [1] IDAL - Investment Development Authority of Lebanon », *IDAL.COM*. [En ligne]. Disponible sur: <https://investinlebanon.gov.lb/>. [Consulté le: 19-sept-2019].
- [2] Q. Abdullah, A. Mahmoud, et A. Al-harethi, « Isolation and identification of fungal post-harvest rot of some fruits in Yemen », *PSM Microbiol.*, vol. 1, n° 1, p. 36–44, 2016.
- [3] M. F. Perez, A. S. Isas, A. Aladdin, H. A. El Enshasy, et J. R. Dib, « Killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons », in *Sustainable Technologies for the Management of Agricultural Wastes*, Springer, p. 87–98, 2018.
- [4] I. M. Brasil et M. W. Siddiqui, « Postharvest quality of fruits and vegetables: An overview », in *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality*, Elsevier, p. 1–40, 2018.
- [5] N. Peña, A. Antón, A. Kamilaris, et P. Fantke, « Modeling ecotoxicity impacts in vineyard production: Addressing spatial differentiation for copper fungicides », *Sci. Total Environ.*, vol. 616, p. 796–804, 2018.
- [6] A. S. Dukare, S. Paul, V. E. Nambi, R. K. Gupta, R. Singh, K. Sharma & R. K. Vishwakarma, « Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review », *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, n° 9, p. 1498–1513, 2019.
- [7] M. Mari, A. Di Francesco, et P. Bertolini, « Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches », *Stewart Postharvest Rev.*, vol. 10, n° 1, p. 1–4, 2014.
- [8] Directive européenne | EcophytoPIC ». [En ligne]. Disponible sur : <http://www.ecophytopic.fr/tr/principes-et-d%C3%A9finitions/directive-europ%C3%A9enne>. [Consulté le: 19-sept-2019].
- [9] A. El-Ghaouth, J. L. Smilanick, et C. L. Wilson, « Enhancement of the performance of *Candidasaitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 19, n° 1, p. 103–110, 2000.
- [10] H. Singh, G. Fairs, et M. Syarhabil, « Anti-fungal activity of *Capsicum frutescence* and *Zingiber officinale* against key post-harvest pathogens in citrus », in *International Conference on Biomedical Engineering and Technology, IPCBEE*, vol. 11, p. 1–6, 2011.
- [11] R. Pangestuti et S.-K. Kim, « Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae », *J. Funct. Foods*, vol. 3, n° 4, p. 255–266, 2011.
- [12] P. N. Ani et H. C. Abel, « Nutrient, phytochemical, and antinutrient composition of Citrus maxima fruit juice and peel extract », *Food Sci. Nutr.*, vol. 6, n° 3, p. 653–658, 2018.
- [13] Z. Moussa, G. Haddad, K. Hilan & A. Bassal, A., « Citrus, Agricultural development project. », 2008.
- [14] FAOSTAT (2016). Lebanon: Citrus fruits, total, production quantity (tons) [en ligne] <http://www.factfish.com/statistic-country/lebanon/citrus+fruits,+total,+production+quantity>
- [15] J. C. Montigaud, R. Sabra, et H. Chahine, « Les filières fruits et légumes frais au Liban : structures, fonctionnement et perspectives. », *AGRO. Met INRA.*, p. 7-18, 2013.
- [16] S. Riachi, « Les agrumes au Liban : une filière en déclin - Soraya Riachi », *L'Orient-Le Jour*, 08-août-2016. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.lorientlejour.com/article/1000628/les-agrumes-au-liban-une-filiere-en-declin.html>. [Consulté le: 20-mars-2019].

- [17] M. Mari, C. Martini, A. Spadoni, W. Rouissi, et P. Bertolini, « Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans* », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 73, p. 56-62, 2012.
- [18] Suiter, D., et Scharf, M., « Insecticide Basics for the pest Management Professional. », *University of Florida.*, 2015.
- [19] C. A. Damalas et I. G. Eleftherohorinos, « Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators », *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 8, n° 5, p. 1402-1419, 2011.
- [20] G. Castro, L. Pérez-Mayán, T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, et R. Cela, « Multianalyte, high-throughput liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the sensitive determination of fungicides and insecticides in wine. », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, n° 3, p. 1139-1150, 2018.
- [21] J. Villaverde Capellán, A. Lara Moreno, M. Rubio Bellido, et E. Morillo González, « Biodegradation of *phenylurea* herbicides by a novel degrading microbial consortium », 2018.
- [22] W. M. A. Niessen, « Group-specific fragmentation of pesticides and related compounds in liquid chromatography–tandem mass spectrometry », *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, n° 25, p. 4061-4070, 2010.
- [23] A. Rifai, « Study of the degradation of pesticides by direct photolysis- structural identification and potential toxicity », Theses, Ecole Polytechnique X, 2013.
- [24] Y. Picó, C. Blasco, et G. Font, « Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview », *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 23, n° 1, p. 45-85, 2004.
- [25] P. Bertelson et R. Joffe, « L’Influence du méprobamate et de l’émylcamate sur la performance humaine dans une tâche sériale prolongée », *Psychopharmacologia*, vol. 3, n° 4, p. 242-253, 1962.
- [26] A. Sadowska, E. Pluygers, M. Narkiewicz, A. Pawelczak, et B. Lata, « Environmental genotoxicity and cancer risk in humans: a combined evaluation correlating the results of the *Tradescantia micronucleus* assay in the field and human biomarker assessments in serum. I. The TRAD-MCN assay. », *Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP*, vol. 3, n° 1, p. 69-78, 1994.
- [27] K.-H. Kim, E. Kabir, et S. A. Jahan, « Exposure to pesticides and the associated human health effects », *Sci. Total Environ.*, vol. 575, p. 525-535, 2017.
- [28] D. Piementel et L. Levitan, « Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests », *BioScience*, vol. 36, p. 86-91, 1986.
- [29] I. C. Yadav, N. L. Devi, J. H. Syed, Z. Cheng, J. Li, G. Zhang, & K. C. Jones. « Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India », *Sci. Total Environ.*, vol. 511, p. 123-137, 2015.
- [30] C. S. Jacobsen et M. H. Hjelmsø, « Agricultural soils, pesticides and microbial diversity », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 27, p. 15-20, 2014.
- [31] A. A. Ashi, « Implantation des échantillonneurs passifs pour le suivi des pesticides dans les milieux aquatiques libanais », thesis, Université de Bordeaux, 2015.
- [32] M. Hvězdová, P. Kosubová, M. Košíková, K. E. Scherr, Z. Šimek, L. Brodský & L. Krkošková, « Currently and recently used pesticides in Central European arable soils », *Sci. Total Environ.*, vol. 613-614, p. 361-370, 2018.

- [33] <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/2439/0/quantites-pesticides-vendues-france.html>).
- [34] A. Trabulsi, « Pollution Des Aliments et Cultures Traitées Par Les Pesticides », Beirut., 1991.
- [35] I. Abou Fakhr, Y. Abou Jaoudeh, J. B. Asta, « Usage Des Pesticides Au Liban », Beirut., 1995.
- [36] H. Gajera, R. Domadiya, S. Patel, M. Kapopara & B. Golakiya, Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system—a review. *Curr Res Microbiol Biotechnol*, 1(4), 133-142., 2013.
- [37] C.-M. Messiaen, D. Blancard, et F. Rouxel, « *Les maladies des plantes maraîchères.* », 3e éd. Editions Quae, 1991.
- [38] A. Ouimet, J. R. Carisse ode, et C. Vigneault, « Mesure d'hygiène dans les entrepôts à fruits et légumes. », *Tüney*, 1999.
- [39] P. Moras, « Entreposage et conservation des fruits et légumes frais : guide pratique de l'utilisation du froid. », *Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes*. 1983.
- [40] D. Macarisin, L. Cohen, A. Eick, G. Rafael, E. Belausov, M. Wisniewski & S. Droby. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Phytopathology*, 97(11), 1491-1500., 2007.
- [41] L. Palou et J.L. Smilanick, « Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. », *Stewart Postharvest Review*, vol. 2, n° 2, p. pp.1-16, 2008.
- [42] A. R. Ballester, M. T. Lafuente, et L. González-Candelas, « Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–*Penicillium digitatum* interaction », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 2, n° 39, p. 115-124, 2006.
- [43] S. Ben-Yehoshua, V. Rodov, J. J. Kim & S. Carmeli, « Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 40, n° 7, p. 1217-1221, 1992.
- [44] J. Dijksterhuis, K. G. van Driel, M.G. Sanders, D. Molenaar, J. A. Houbraken, R. A. Samson & E.P. Kets, « Trehalose degradation and glucose efflux precede cell ejection during germination of heat-resistant ascospores of *Talaromyces macrosporus* », *Arch. Microbiol.*, vol. 178, n° 1, p. 1-7, 2002.
- [45] B. P. De, « New antifungal agents and preparations. », *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 16, n° 2, p. 147-150, 2000.
- [46] A. K. Nussbaum, T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanović, K. Dietz, & H. G. Rammensee, « Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome β subunits deduced from digests of enolase 1 », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n° 21, p. 12504-12509, 1998.
- [47] A. Χαρβάλου, X. Λιάπη, A. M. Τσατσάκης, M. N. Τζατζαράκης, et Π. Γαλανοπούλου, « New nystatin polymeric complexes and their in vitro antifungal evaluation in a model study with fusarium oxysporum », *www.researchgate.net*, 2015.
- [48] T. Tanaka, « Reproductive and neurobehavioral effects of imazalil administered to mice », *Reprod. Toxicol.*, vol. 9, n° 3, p. 281-288, 1995.
- [49] W. J. Janisiewicz et L. Korsten, « Biological control of postharvest diseases of fruits. », *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 40, p. 411-441, 2002.
- [50] M. Kavková et V. Čurn, « *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales) », *Mycopathologia*, vol. 159, n° 1, p. 53-63, 2005.

- [51] S. K. Bencheqroun, M. Bajji, S. Massart, M. Labhilili, S. E. Jaafari, et M. H. Jijakli, « In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 46, n° 2, p. 128-135, 2007.
- [52] A. A. Pimenta, D. C. M. Amorim, et C. M. N. Candido, « Thermospheric dark band structures at low latitudes in the Southern Hemisphere under different solar activity conditions: A study using OI 630 nm emission all-sky images », *Geophys. Res. Lett.*, vol. 35, n° 16, 2008.
- [53] W. J. Janisiewicz et J. Roitman, « Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia* », *Phytopathol. USA*, 1988.
- [54] R. S. Pimenta, F. L. Silva, J. F. Silva, P. B. Morais, D. T. Braga, C. A. Rosa & A. Corrêa Jr, « Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges », *Braz. J. Microbiol.*, vol. 39, n° 1, p. 85-90, 2008.
- [55] P. Liu, Y. Cheng, M. Yang, Y. Liu, K. Chen, C. A. Long & X. Deng, « Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits », *BMC Microbiol.*, vol. 14, n° 1, p. 242, 2014.
- [56] T. Gomiero, « Agriculture and degrowth: State of the art and assessment of organic and biotech-based agriculture from a degrowth perspective », *J. Clean. Prod.*, vol. 197, p. 1823-1839, 2018.
- [57] T. Gomiero, « Food quality assessment in organic vs. conventional agricultural produce: Findings and issues », *Appl. Soil Ecol.*, vol. 123, p. 714-728, 2018.
- [58] L. Marutescu, M. Popa, C. Saviuc, V. Lazar, et M. C. Chifiriuc, « 8 - Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity », in *New Pesticides and Soil Sensors*, A. M. Grumezescu, Éd. Academic Press, p. 311-335, 2017.
- [59] Y. Thakore, « The biopesticide market for global agricultural use », *Ind. Biotechnol.*, vol. 2, n° 3, p. 194-208, 2006.
- [60] J. Deravel, F. Krier, et P. Jacques, « Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique) », *Biotechnol. Agron. Société Environ.*, vol. 18, n° 2, p. 220-232-232, 2014.
- [61] K. L. Bailey, S. M. Boyetchko, et T. Längle, « Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides », *Biol. Control*, vol. 52, n° 3, p. 221-229, 2010.
- [62] I. Mnif et D. Ghribi, « Potential of bacterial derived biopesticides in pest management », *Crop Prot.*, vol. 77, p. 52-64, 2015.
- [63] R. van Driesche, M. Hoddle, et T. Center, *Control of Pests and Weeds by Natural Enemies: An Introduction to Biological Control*. John Wiley & Sons, 2009.
- [64] A. E. Hajek et R. J. St. Leger, « Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts », *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 39, n° 1, p. 293-322, 1994.
- [65] W. Fang, B. Leng, Y. Xiao, K. Jin, J. Ma, Y. Fan & Y. Pei « Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application to Improve Fungal Strain Virulence », *Appl. Env. Microbiol.*, vol. 71, n° 1, p. 363-370, 2005.
- [66] B. Szewczyk, L. Hoyos-Carvajal, M. Paluszek, I. Skrzecz, et M. Lobo de Souza, « Baculoviruses — re-emerging biopesticides », *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, n° 2, p. 143-160, 2006.

- [67] A. Kessler et I. T. Baldwin, « PLANT RESPONSES TO INSECT HERBIVORY: The Emerging Molecular Analysis », *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 53, n° 1, p. 299-328, 2002.
- [68] D. Chandler, G. Davidson, W. P. Grant, J. Greaves, et G. M. Tatchell, « Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability », *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 19, n° 5, p. 275-283, 2008.
- [69] H. Singh, G. Fairs & M. Syarhabil, « Anti-fungal activity of *Capsicum frutescence* and *Zingiber officinale* against key post-harvest pathogens in citrus. », In *International Conference on Biomedical Engineering and Technology, IPCBEE* (Vol. 11, pp. 1-6), 2011.
- [70] M. Musto, G. Potenza, et C. Francesco, « Inhibition of *Penicillium digitatum* by a crude extract from *Solanum nigrum* leaves », *BASE*, 2014.
- [71] V. Andreu, A. Levert, A. Amiot, A. Cousin, N. Aveline, et C. Bertrand, « Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming », *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 25, n° 30, p. 29971-29982, 2018.
- [72] K. Ncama, A. Mditshwa, S. Z. Tesfay, N. C. Mbili, et L. S. Magwaza, « Topical procedures adopted in testing and application of plant-based extracts as bio-fungicides in controlling postharvest decay of fresh produce », *Crop Prot.*, vol. 115, p. 142-151, 2019.
- [73] N. Tao, L. Jia, et H. Zhou, « Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum* », *Food Chem.*, vol. 153, p. 265-271, 2014.
- [74] C. Bertrand, O. Couillerot, et D. Caron, « La protection biologique intégrée et le biocontrôle: principes et importance dans la gestion des ravageurs et maladies des plantes », 2019.
- [75] J. Popovici, C. Bertrand, E. Bagnarol, M. P. Fernandez, et G. Comte, « Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity », *Nat. Prod. Res.*, vol. 22, n° 12, p. 1024-1032, 2008.
- [76] M. L. Goñi, N. A. Gañán, J. M. Herrera, M. C. Strumia, A. E. Andreatta, et R. E. Martini, « Supercritical CO₂ iof LDPE films with terpene ketones as biopesticides against corn weevil (*Sitophilus zeamais*) », *J. Supercrit. Fluids*, vol. 122, p. 18-26, 2017.
- [77] D. M. Suckling, « Issues affecting the use of pheromones and other semiochemicals in orchards », *Crop Prot.*, vol. 19, n° 8, p. 677-683, 2000.
- [78] S. Heuskin, F. J. Verheggen, É. Haubruge, J.-P. Wathelet, et G. Lognay, « The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies », *BASE*, 2011.
- [79] Protection intégrée: principes et définitions ». [En ligne]. Disponible sur: <https://agriculture.gouv.fr/protection-integree-principes-et-definitions>. [Consulté le: 25-sept-2019].
- [80] Veille réglementaire - Ecophyto PRO : réduire et améliorer l'utilisation des phytos ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ecophyto-pro.fr/n/veille-reglementaire/n:321>. [Consulté le: 25-sept-2019].
- [81] Produits phytos et réglementation ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.uipp.org/La-protection-des-cultures/Produits-phytos-et-reglementation>. [Consulté le: 25-sept-2019]
- [82] A. Mie, H. R. Andersen, S. Gunnarsson, J. Kahl, E. Kesse-Guyot, E. Rembialkowska & P. Grandjean, « Human health implications of organic food and organic agriculture: a comprehensive review », *Environ. Health*, vol. 16, n° 1, p. 111, 2017.
- [83] C. Grovermann, P. Schreinemachers, S. Riwithong, et T. Berger, « 'Smart' policies to reduce pesticide use and avoid income trade-offs: An agent-based model applied to Thai agriculture », *Ecol. Econ.*, vol. 132, p. 91-103, 2017.

- [84] P. Chitrampalam, B. M. Wu, S. T. Koike, et K. V. Subbarao, « Interactions Between *Coniothyrium minitans* and *Sclerotinia minor* Affect Biocontrol Efficacy of *C. minitans* », *Phytopathology*, vol. 101, n° 3, p. 358-366, 2010.
- [85] C. Vincent, M. S. Goettel, et G. Lazarovits, *Biological Control: A Global Perspective : Case Studies from Around the World*. CABI, 2007.
- [86] T. Glare, J. Caradus, W. Gelernter, T. Jackson, N. Keyhani, J. Köhl & A. Stewart, « Have biopesticides come of age? », *Trends Biotechnol.*, vol. 30, n° 5, p. 250-258, 2012.
- [87] M. D. Taylor, S. J. Klaine, F. P. Carvalho, et D. Barcelo, *Pesticide Residues in Coastal Tropical Ecosystems: Distribution, Fate and Effects*. CRC Press, 2002.
- [88] W. Aktar, D. Sengupta, et A. Chowdhury, « Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards », *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 2, n° 1, p. 1-12, 2009.
- [89] B. Singh et A. Kaur, « Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review », *LWT*, vol. 87, p. 93-101, 2018.
- [90] F. P. Carvalho, « Pesticides, environment, and food safety », *Food Energy Secur.*, vol. 6, n° 2, p. 48-60, 2017.
- [91] V. Pozderka, « Bellinger, E. G. and Sigeo, D. C. (2015): Freshwater algae: identification, enumeration and use as bioindicators », *Acta Botanica Hungarica*, 2015.
- [92] B. Messyas, « Enteromorpha (Chlorophyta) populations in the Nielba River and Lake Laskownickie », 2006.
- [93] K. Manivannan, G. Thirumaran, G. Karthikai Devi, P. Anantharaman & T. Balasubramanian, « Proximate composition of different group of seaweeds from *Vedalai* Coastal waters (Gulf of Mannar): Southeast Coast of India. », *Middle-East Journal of scientific research*, 4(2), 72-77, 2009.
- [94] S. L. Holdt et S. Kraan, « Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. », *J. Appl. Phycol.*, vol. 23, n° 3, p. 543-597, 2011.
- [95] A. M. S. Mayer, A. D. Rodríguez, R. G. S. Berlinck, et M. T. Hamann, « Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1790, n° 5, p. 283-308, 2009.
- [96] M. D. Guiry, « How Many Species of Algae Are There? », *J. Phycol.*, vol. 48, n° 5, p. 1057-1063, 2012.
- [97] B. Negreanu-Pîrjol, T. Negreanu-Pîrjol, G. Paraschiv, M. Bratu, R. Sîrbu, F. Roncea & A. Meghea, « Physical-chemical characterization of some green and red macrophyte algae from the Romanian Black Sea littoral. », *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 12(2), 173., 2011.
- [98] A. Pushparaj, R. S. Raubbin, et T. Balasankar, « Antibacterial activity of *Kappaphycus alvarezii* and *Ulva lactuca* extracts against human pathogenic bacteria », *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 3, n° 1, p. 432–436, 2014.
- [99] Scientific Publications - University of Bacau [Revues] (scientific reviews, abstracts and articles) ». [En ligne]. Disponible sur: <http://pubs.ub.ro/index.php?pg=revues&rev=csc6&num=200607&vol=1&aid=1079>. [Consulté le: 28-mars-2019].
- [100] M. D. Guiry et G. M. Guiry, « AlgaeBase », *AlgaeBase*, 2008.

- [101] H. Kanaan, O. Belous, et A. Chokr, « Diversity investigation of the seaweeds growing on the Lebanese coast », *J. Mar. Sci. Res. Dev.*, vol. 5, n° 1, p. 1, 2015.
- [102] G. F. El-Said et A. El-Sikaily, « Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt », *Environ. Monit. Assess.*, vol. 185, n° 7, p. 6089-6099, 2013.
- [103] A. Rasyid, « Evaluation of nutritional composition of the dried seaweed *Ulva lactuca* from Pameungpeuk waters, Indonesia », *Trop. Life Sci. Res.*, vol. 28, n° 2, p. 119, 2017.
- [104] H. M. Khairy et M. A. El-Sheikh, « Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt », *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 22, n° 5, p. 623–630, 2015.
- [105] M. M. Ismail, G. M. El Zokm, et A. A. M. El-Sayed, « Variation in biochemical constituents and master elements in common seaweeds from Alexandria Coast, Egypt, with special reference to their antioxidant activity and potential food uses: prospective equations », *Environ. Monit. Assess.*, vol. 189, n° 12, p. 648, 2017.
- [106] A. Chbani, S. Majed, et H. Mawlawi, « Mineral Content of Mediterranean Seaweeds, *Padina pavonica* L. (Pheophytae, *Ulva lactuca* L. and *Ulva linza* L. (Chlorophytae) for Biofertilizing Use », *Int. J. Hortic. Sci. Technol.*, vol. 2, n° 2, p. 133–140, 2015.
- [107] D. B. Stengel, S. Connan, et Z. A. Popper, « Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application », *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, n° 5, p. 483-501, 2011.
- [108] Y.-X. Li et S.-K. Kim, « Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: An overview », *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 20, n° 6, p. 1461-1466, 2011.
- [109] T. Funda, « Biochemical composition of some red and green seaweeds from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey », *J. Black Sea/Mediterranean Environment*, vol. Vol. 21, n° No. 3: 239-249, 2015.
- [110] T. T. T. Thanh, T. M. T. Quach, T. N. Nguyen, D. V. Luong, M. L. Bui, et T. T. V. Tran, « Structure and cytotoxic activity of ulvan extracted from green seaweed *Ulva lactuca* », *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. PA, n° 93, p. 695-702, 2016.
- [111] J. T. Kidgell, M. Magnusson, R. de Nys, et C. R. K. Glasson, « Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function », *Algal Res.*, vol. 39, p. 101422, 2019.
- [112] A. Robic, D. Bertrand, J.-F. Sassi, Y. Lerat, et M. Lahaye, « Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics », *J. Appl. Phycol.*, vol. 21, n° 4, p. 451-456, 2009.
- [113] H. Yaich, H. Garna, S. Besbes, M. Paquot, C. Blecker, et H. Attia, « Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia », 2011.
- [114] S. L. Holdt et S. Kraan, « Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation », *J. Appl. Phycol.*, vol. 23, n° 3, p. 543-597, 2011.
- [115] H. K. Mæhre, M. K. Malde, K.-E. Eilertsen, et E. O. Elvevoll, « Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed », *J. Sci. Food Agric.*, vol. 94, n° 15, p. 3281-3290, 2014.
- [116] M. Kendel, G. Wielgosz-Collin, S. Bertrand, C. Roussakis, N. Bourgougnon, et G. Bedoux, « Lipid composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives », *Mar. Drugs*, vol. 13, n° 9, p. 5606–5628, 2015.

- [117] J. Ortiz, N. Romero, P. Robert, J. Araya, J. Lopez-Hernández, C. Bozzo & A. Rios, « Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. », *Food chemistry*, 99(1), 98-104., 2006.
- [118] S. U. Kadam, B. K. Tiwari, et C. P. O'Donnell, « Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, n° 20, p. 4667-4675, 2013.
- [119] K. Ramluckan, K. G. Moodley, et F. Bux, « An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method », *Fuel*, vol. 116, p. 103-108, 2014.
- [120] N. Kamaladhasan et S. K. Subramanian, « Influence of seaweed liquid fertilizers on legume crop, red gram », *J Basic Appl Biol*, vol. 3, n° 1-2, p. 21–24, 2009.
- [121] B. Rhimou, R. Hassane, et B. Nathalie, « Antiviral activity of the extracts of Rhodophyceae from Morocco », *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 9, n° 46, p. 7968–7975, 2010.
- [122] U. N. I. D. Organization, S. S. Handa, S. P. S. Khanuja, G. Longo, et D. D. Rakesh, *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies, 2008.
- [123] F. Sahena, I. S. M. Zaidul, S. Jinap, A. A. Karim, K. A. Abbas, N. A. N. Norulaini & A. K. M. Omar, « Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review », *J. Food Eng.*, vol. 95, n° 2, p. 240-253, 2009.
- [124] N. Suzuki, « Studies on the manufacture of algin from brown algae », *Mem. Fac. Fish. HOKKAIDO Univ.*, vol. 3, n° 2, p. 93–158, 1955.
- [125] M. Hayes, *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [126] L. Wang et C. L. Weller, « Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants », *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 17, n° 6, p. 300-312, 2006.
- [127] H. S. S. Sharma, C. Fleming, C. Selby, J. R. Rao, et T. Martin, « Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses », *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, n° 1, p. 465-490, 2014.
- [128] D. MCHUGH, « A guide to the seaweed industry », *FAO Fish. Tech. Pap.*, vol. 441, p. 105, 2003.
- [129] B. Kaufmann, P. Christen, et J.-L. Veuthey, « Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides », *Phytochem. Anal.*, vol. 12, n° 5, p. 327-331, 2001.
- [130] M. Poux, P. Cagnet, C. Gourdon, « Génie des procédés durables-Du concept à la concrétisation industrielle », 2010.
- [131] T. Yu-Qing, K. Mahmood, R. Shehzadi, et M. F. Ashraf, « *Ulva lactuca* and Its Polysaccharides: Food and Biomedical Aspects », *J. Biol.*, p. 13, 2016.
- [132] Y. V. Yuan, D. E. Bone, et M. F. Carrington, « Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro », *Food Chem.*, vol. 91, n° 3, p. 485-494, 2005.
- [133] V. R. Whankatte et J. S. Ambhore, « Study of phytochemical screening & antioxidant activities of *Cladophora glomerata* Linn. collected from Raigad Coast of Konkan (MS) India », *J Sci Nat*, vol. 7, p. 659–663, 2016.
- [134] H. Yaich, A. B. Amira, F. Abbes, M. Bouaziz, S. Besbes, A. Richel & H. Garna, « Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast », *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, p. 1430-1439, 2017.

- [135] K. H. S. Farvin, A. Surendraraj, A. Al-Ghunaim, et F. Al-Yamani, « Chemical profile and antioxidant activities of 26 selected species of seaweeds from Kuwait coast », *J. Appl. Phycol.*, 2019.
- [136] C. Nan, H. Zhang, S. Lin, G. Zhao, et X. Liu, « Allelopathic effects of *Ulva lactuca* on selected species of harmful bloom-forming microalgae in laboratory cultures », *Aquat. Bot.*, vol. 89, n° 1, p. 9–15, 2008.
- [137] A. M. Deveau, Z. Miller-Hope, E. Lloyd, B. S. Williams, C. Bolduc, J. M. Meader & K. M. Burkholder, « Antimicrobial activity of extracts from macroalgae *Ulva lactuca* against clinically important *Staphylococci* is impacted by lunar phase of macroalgae harvest », *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 62, n° 5, p. 363–371, 2016.
- [138] G. Alang, R. Kaur, A. Singh, P. Budlakoti, A. Singh, A. and P. Singla, « Antimicrobial activity of *Ulva lactuca* extracts and its fractions. », *Pharmacology online*, vol. 3, n° pp.107-117., 2009.
- [139] P. Aruna¹, P. Mansuya¹, S. Sridhar, et J. S. K. and S. Babu, « Pharmacognostical and Antifungal Activity of Selected Seaweeds from Gulf of Mannar Region », *Recent Res. Sci. Technol.*, vol. 2, n° 1, oct. 2010.
- [140] Ö. Ertürk et B. Taş, « Antibacterial and antifungal effects of some marine algae », *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, vol. 17, n° Suppl A, p. S121–S124, 2011.
- [141] M. Abbassy, « Insecticidal and Fungicidal Activity of *Ulva lactuca* Linnaeus (Chlorophyta) Extracts and their Fractions », *Annu. Res. Rev. Biol.*, vol. 4, n° 13, p. 2252-2262, 2014.
- [142] D. J. Newman, G. M. Cragg, & K. M. Snader, « Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002 », *Journal of natural products.*, vol. 66, p. 1022-1037, 2003.
- [143] P. A. Moscoso-Ramírez, C. Montesinos-Herrero, et L. Palou, « Control of citrus postharvest *penicillium* molds with sodium ethylparaben », *Crop Prot.*, vol. 46, p. 44-51, 2013.
- [144] F. Fallanaj, A. Ippolito, A. Ligorio, F. Garganese, C. Zavanella, et S. M. Sanzani, « Electrolyzed sodium bicarbonate inhibits *Penicillium digitatum* and induces defence responses against green mould in citrus fruit », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. C, n° 115, p. 18-29, 2016.
- [145] S. Droby, E. Chalutz, B. Horev, L. Cohen, V. Gaba, C. L. Wilson & M. Wisniewski « Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum* », *Plant Pathol.*, vol. 42, n° 3, p. 418-424, 1993.
- [146] K. Youssef, S. M. Sanzani, A. Ligorio, A. Ippolito, et L. A. Terry, « Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 87, p. 61-69, 2014.
- [147] Z. Shi, F. Wang, Y. Lu, et J. Deng, « Combination of chitosan and salicylic acid to control postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum* in grapefruit fruit », *Sci. Hortic.*, vol. 233, p. 54–60, 2018.
- [148] S. Droby, V. Vinokur, B. Weiss, L. Cohen, A. Daus, E. E. Goldschmidt & R. Porat, « Induction of Resistance to *Penicillium digitatum* in Grapefruit by the Yeast Biocontrol Agent *Candida oleophila* », *Phytopathology*, vol. 92, n° 4, p. 393-399, 2002.
- [149] L. A. Terry et D. C. Joyce, « Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 32, n° 1, p. 1-13, 2004.
- [150] L. C. van Loon, M. Rep, et C. M. J. Pieterse, « Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants », *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 44, n° 1, p. 135-162, 2006.
- [151] T. Boller et U. Vögeli, « Vacuolar localization of ethylene-induced chitinase in bean leaves », *Plant Physiol.*, vol. 74, n° 2, p. 442–444, 1984.

- [152] R. Porat, T. G. Mccollum, V. Vinokur, et S. Droby, « Effects of Various Elicitors on the Transcription of a β -1,3-endoglucanase Gene in Citrus Fruit », *J. Phytopathol.*, vol. 150, n° 2, p. 70-75, 2002.
- [153] A. Ippolito, A. El Ghaouth, C. L. Wilson, et M. Wisniewski, « Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 19, n° 3, p. 265-272, 2000.
- [154] G. Arras, « Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 8, n° 3, p. 191-198, 1996.
- [155] A. R. Ballester, A. Izquierdo, M. T. Lafuente, et L. González-Candelas, « Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 56, n° 1, p. 31-38, 2010.
- [156] K. Youssef, S. M. Sanzani, A. Ligorio, A. Ippolito, et L. A. Terry, « Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 87, p. 61-69, 2014.
- [157] Z. Shi, F. Wang, Y. Lu, et J. Deng, « Combination of chitosan and salicylic acid to control postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum* in grapefruit fruit », *Sci. Hortic.*, vol. 233, p. 54–60, 2018.
- [158] J. L. Bi et G. W. Felton, « Foliar oxidative stress and insect herbivory: Primary compounds, secondary metabolites, and reactive oxygen species as components of induced resistance », *J. Chem. Ecol.*, vol. 21, n° 10, p. 1511-1530, 1995.
- [159] M. E. Pérez-Pérez, S. D. Lemaire, et J. L. Crespo, « Reactive Oxygen Species and Autophagy in Plants and Algae », *Plant Physiol.*, vol. 160, n° 1, p. 156-164, 2012.
- [160] J. Singh, N. S. Mishra, Uma, S. Banerjee, et Y. C. Sharma, « Comparative studies of physical characteristics of raw and modified sawdust for their use as adsorbents for removal of acid dye. », *BioResources*, vol. 6, n° 3, p. 2732-2743-2743, 2011.
- [161] N. Tao, Q. OuYang, et L. Jia, « Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism », *Food Control*, vol. 41, p. 116-121, 2014.
- [162] K. J. Kim, W. S. Sung, B. K. Suh, S. K. Moon, J. S. Choi, J. G. Kim & D. G. Lee « Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans* », *Biometals*, vol. 22, n° 2, p. 235–242, 2009.
- [163] É. Leiter, H. Szappanos, C. Oberparleiter, L. Kaiserer, L. Csernoch, T. Pusztahelyi & F. Marx, « Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, n° 6, p. 2445–2453, 2005.
- [164] J. Palma-Guerrero, I.-C. Huang, H.-B. Jansson, J. Salinas, L. V. Lopez-Llorca, et N. D. Read, « Chitosan permeabilizes the plasma membrane and kills cells of *Neurospora crassa* in an energy dependent manner », *Fungal Genet. Biol.*, vol. 46, n° 8, p. 585–594, 2009.
- [165] Y. Wu, Q. OuYang, et N. Tao, « Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum* », *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, n° 10, p. 3853–3858, 2016.
- [166] J. Liu, Y. Zong, G. Qin, B. Li, et S. Tian, « Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of silicon against *Penicillium digitatum* », *Curr. Microbiol.*, vol. 61, n° 4, p. 274–279, 2010.

- [167] S. Dou, S. Liu, X. Xu, Q. OuYang, et N. Tao, « Octanal inhibits spore germination of *Penicillium digitatum* involving membrane peroxidation », *Protoplasma*, vol. 254, n° 4, p. 1539–1545, 2017.
- [168] J. Li, H. Li, S. Ji, T. Chen, S. Tian, et G. Qin, « Enhancement of biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii* by cinnamic acid against *Penicillium italicum* in citrus fruit », *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 149, p. 42–49, 2019.
- [169] C. R. Barmore et G. E. Brown, « Role of pectolytic enzymes and galacturonic acid in citrus fruit decay caused by *Penicillium digitatum* », *Phytopathology*, vol. 69, p. 675–678, 1979.
- [170] A. Tantaoui-Elaraki et L. Beraoud, « Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by essential oils of selected plant materials. », *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer*, vol. 13, n° 1, p. 67-72, 1994.
- [171] G. T. Prusky, N. M. Alam, S. Beekman, et R. M. Douglas, « Rapid Quantification of Adult and Developing Mouse Spatial Vision Using a Virtual Optomotor System », *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, n° 12, p. 4611-4616, 2004.
- [172] E. W. Roberts, A. Deonarine, J. O. Jones, A. E. Denton, C. Feig, S. K. Lyons & Q. Zhao, « Depletion of stromal cells expressing fibroblast activation protein- α from skeletal muscle and bone marrow results in cachexia and anemia », *J. Exp. Med.*, vol. 210, n° 6, p. 1137–1151, 2013.
- [173] R. H. Bischof, J. Ramoni, et B. Seiboth, « Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei* », *Microb. Cell Factories*, vol. 15, n° 1, p. 106, 2016.
- [174] P. Becher, « Emulsions: theory and practice », 1965.
- [175] M. Chappat, « Some applications of emulsions », *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 91, p. 57–77, 1994.
- [176] D. Clause, D. Daniel-David, F. Gomez, L. Komunjer, I. Pezron, C. Dalmazzone & C. Noïk, « Emulsion stability and interfacial properties—application to complex emulsions of industrial interest », *Colloid Stab. Appl. Pharm.*, vol. 3, p. 119–149, 2007.
- [177] E. Dickinson et D. J. McClements, *Advances in food colloids*. Springer Science & Business Media, 1995.
- [178] E. Dickinson et G. Stainsby, *Colloids in food*. Applied Science Publishers, 1982.
- [179] T. Tadros, « Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions », *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 108, p. 227–258, 2004.
- [180] Y. Li, M. Hu, H. Xiao, Y. Du, E. A. Decker, et D. J. McClements, « Controlling the functional performance of emulsion-based delivery systems using multi-component biopolymer coatings », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 76, n° 1, p. 38–47, 2010.
- [181] A. Lips, I. J. Campbell, et E. G. Pelan, « Aggregation mechanisms in food colloids and the role of biopolymers », in *Food polymers, gels and colloids*, Elsevier, 1991, p. 1–21.
- [182] E. Dickinson, « Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems », *Food Hydrocoll.*, vol. 17, n° 1, p. 25–39, 2003.
- [183] D. J. McClements, « Emulsion stability », *Food Emuls. Princ. Pract. Tech. CRC Press Boca Raton Lond. N. Y. Wash. DC*, p. 185–233, 1999.
- [184] F. Leal-Calderon, V. Schmitt, et J. Bibette, *Emulsion science: basic principles*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [185] J. P. Canselier & M. Poux, « Procédés d'émulsification. Mécanismes de formation des émulsions. », *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, vol. J2152, 2004.
- [186] H. Schubert et R. Engel, « Product and Formulation Engineering of Emulsions », *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 82, n° 9, p. 1137-1143, 2004.

- [187] D. J. McClements, « Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions », *Langmuir*, vol. 21, n° 21, p. 9777–9785, 2005.
- [188] D. J. McClements, *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press, 2015.
- [189] P. Sherman, « critique of some methods proposed for evaluating the emulsifying capacity and emulsion stabilizing performance of vegetable proteins », *Ital. J. Food Sci. IJFS Riv. Ital. Sci. Degli Alimenti*, 1995.
- [190] K. N. Pearce et J. E. Kinsella, « Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 26, n° 3, p. 716–723, 1978.
- [191] D. Clause, J. L. Lanoisellé, I. Pezron, et K. Saleh, « Formulation of a water-in-oil emulsion encapsulating polysaccharides to improve the efficiency of spraying of plant protection products », *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 536, p. 96-103, 2018.
- [192] Y. A. Batta, « Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion », *Crop Prot.*, vol. 23, n° 1, p. 19-26, 2004.
- [193] E. O. M. Ali, N. A. Shakil, V. S. Rana, D. J. Sarkar, S. Majumder, P. Kaushik, & J. Kumar « Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* », *Industrial crops and products*, 108, 379-387. 2017.
- [194] D. Wu, J. Lu, S. Zhong, P. Schwarz, B. Chen, et J. Rao, « Effect of chitosan coatings on physical stability, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of lecithin stabilized cinnamon oil-in-water emulsions », *LWT*, 106, 98-104., 2019.
- [195] S. Ribes, A. Fuentes, P. Talens, J. M. Barat, G. Ferrari, et F. Donsì, « Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger* », *Food Control*, vol. PB, n° 73, p. 784-795, 2017.
- [196] G. S. Dhillon, S. K. Brar, M. Verma, et R. D. Tyagi, « Recent advances in citric acid bio-production and recovery », *Food Bioprocess Technol.*, vol. 4, n° 4, p. 505–529, 2011.
- [197] C. R. Soccol, L. P. S. Vandenberghe, C. Rodrigues, A. Pandarey, « Next perspectives for citric acid production and application. », *Food Technology and Biotechnology*, 44, 141-149, 2006.
- [198] A. K. Kolah, N. S. Asthana, D. T. Vu, C. T. Lira, et D. J. Miller, « Reaction kinetics of the catalytic esterification of citric acid with ethanol », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 46, n° 10, p. 3180–3187, 2007.
- [199] G. L. Hasenhuettl et R. W. Hartel, *Food emulsifiers and their applications*, vol. 40. Springer, 2008.
- [200] A. Behr, « Ueber das Vorkommen von Aconitsäure im Zuckerrohrsaft und Colonialzucker », *Berichte Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 10, n° 1, p. 351–355, 1877.
- [201] R. E. Miller et S. M. Cantor, « Aconitic acid, a by-product in the manufacture of sugar », in *Advances in carbohydrate chemistry*, vol. 6, Elsevier, 1951, p. 231–249, 1951.
- [202] A. Petit, C. Roussel, et L. Corcodel, « Whole stalk green cane deterioration indicators to assess mixed juice quality », in *Proc S Afr Sug Technol Ass*, vol. 82, p. 200–213, 2009.
- [203] J. A. Ambler et E. J. Roberts, « The effect of pH on the stability of cis-aconitic acid in dilute solution », *J. Org. Chem.*, vol. 13, n° 3, p. 399–402, 1948.
- [204] L. L. Buckholz Jr et L. G. Scharpf, « Treating a meaty flavored foodstuff with a combination of a sclareolide and aconitic or gluconic acid », U.S. Patent No 5,372,834, 1994.
- [205] E. N. Gutierrez et V. Lamberti, « Preparation of polycarboxylic compounds », 1983.
- [206] C. E. Voll, R. Victoria Filho, et E. Voll, « Use of vinasse and sugarcane trash extract in weed control. », in *XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM)*

- I Congreso Iberoamericano de Ciencia de las Malezas, IV Congreso Nacional de Ciencia de Malezas, Matanzas, Cuba, 8 al 11 de noviembre del 2005*, p. 661–662, 2005.
- [207] E. de Faria Garcia, M. A. de Oliveira, A. M. Godin, W. C. Ferreira, L. F. S. Bastos, M. de Matos Coelho & F. C. Braga, « Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves », *Phytomedicine*, vol. 18, n° 1, p. 80–86, 2010.
- [208] I. Kuchma, A. Volianskiï, V. F. Moskalenko, T. V. Tkachuk, A. I. Dobroskok, A. V. Martynov & S. D. Peremot, « The use of liposomal form of phenylimide of cis-aconitic acid in herpes therapy », *Phytomedicine*, 18(1), 80-86., 2010.
- [209] W. Piang-Siong, P. De Caro, A. Marvilliers, X. Chasseray, B. Payet, A. S. C. Sing & B. Illien, « Contribution of trans-aconitic acid to DPPH scavenging ability in different media », *Food Chem.*, vol. 214, p. 447–452, 2017.
- [210] F. C. Magne et R. R. Mod, « Plasticizers from Aconitic and Tricarballic Acids », *Ind. Eng. Chem.*, vol. 45, n° 7, p. 1546–1547, 1953.
- [211] R. A. Sheldon, I. Arends, et U. Hanefeld, *Green chemistry and catalysis*. John Wiley & Sons, 2007.
- [212] P. T. Anastas et E. S. Beach, « Green chemistry: the emergence of a transformative framework », *Green Chem. Lett. Rev.*, vol. 1, n° 1, p. 9–24, 2007.
- [213] B. M. Trost, « On inventing reactions for atom economy », *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, n° 9, p. 695–705, 2002.
- [214] D. J. Constable, A. D. Curzons, L. M. F. dos Santos, G. R. Geen, R. E. Hannah, J. D. Hayler, R. L. Webb, « Green chemistry measures for process research and development », *Green Chem.*, vol. 3, n° 1, p. 7–9, 2001.
- [215] D. J. Benedict, S. J. Parulekar, et S.-P. Tsai, « Esterification of Lactic Acid and Ethanol with/without Pervaporation », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 42, n° 11, p. 2282-2291, 2003.
- [216] P. L. Gordon, R. Aronowitz, « Noncatalytic esterification of octyl alcohol and polybasic. » *Industrial and Engineering Chemistry*, 1945, 37, 780-782, 2019.
- [217] E. J. Roberts, L. F. Martin, F. C. Magne, R. R. Mod, « Aconitic and tricarballic acid ester as vinyl plasticizers. » *Rubber World*, 1954, 130, 801–804, 2019.
- [218] E.R. Meinche, « Method of pest control. », U.S. Patent No 2,475,629, 1949
- [219] D. P. de Oliveira, T. do Valle Moreira, N. V. Batista, J. D. de Souza Filho, F. A. Amaral, M.M. Teixeira & F.C. Braga, « Esterification of trans-aconitic acid improves its anti-inflammatory activity in LPS-induced acute arthritis », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 99, p. 87-95, 2018.
- [220] G. S. Grigoryan, Z. G. Grigoryan, et A. T. MALKHASYAN, « Obtaining Esters of Citric Acid with High Aliphatic Alcohols », *Chem. Biol.*, vol. 51, n° 2, p. 88-91, 2017.
- [221] M. L. Suárez-Quiroz, A. Alonso Campos, G. Valerio Alfaro, O. González-Ríos, P. Villeneuve, et M. C. Figueroa-Espinoza, « Anti-*Aspergillus* activity of green coffee 5-O-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters », *Microb. Pathog.*, vol. 61-62, p. 51-56, 2013.
- [222] F. C. S. Pires et R. da Silva Pena, « Optimization of spray drying process parameters for tucupi powder using the response surface methodology », *J. Food Sci. Technol.*, vol. 54, n° 11, p. 3459-3472, 2017.
- [223] C. Chang et M. T. Nickerson, « Encapsulation of omega 3-6-9 fatty acids-rich oils using protein-based emulsions with spray drying », *J. Food Sci. Technol.*, vol. 55, n° 8, p. 2850-2861, 2018.

- [224] A. M. Sun, « Microencapsulation of pancreatic islet cells: A bioartificial endocrine pancreas », in *Methods in Enzymology*, vol. 137, Academic Press, p. 575-580, 1988.
- [225] S. Benita, A. Hoffman, et M. Donbrow, « Microencapsulation of paracetamol using polyacrylate resins (Eudragit Retard), kinetics of drug release and evaluation of kinetic model », *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 37, n° 6, p. 391-395, 1985.
- [226] Y.-J. Jeon, T. Vasanthan, F. Temelli, et B.-K. Song, « The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation », *Food Res. Int.*, vol. 36, n° 4, p. 349-355, 2003.
- [227] C. Saénz, S. Tapia, J. Chávez, et P. Robert, « Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) », *Food Chem.*, vol. 114, n° 2, p. 616-622, 2009.
- [228] A. C. A. Roque, A. Bicho, I. L. Batalha, A. S. Cardoso, et A. Hussain, « Biocompatible and bioactive gum Arabic coated iron oxide magnetic nanoparticles », *J. Biotechnol.*, vol. 144, n° 4, p. 313-320, 2009.
- [229] A. K. Anal, W. F. Stevens, et C. Remuñán-López, « Ionotropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin », *Int. J. Pharm.*, vol. 312, n° 1, p. 166-173, 2006.
- [230] C. Remuñán-López, M. L. Lorenzo-Lamosa, J. L. Vila-Jato, et M. J. Alonso, « Development of new chitosan–cellulose multicore microparticles for controlled drug delivery », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 45, n° 1, p. 49-56, 1998.
- [231] S. Drusch, « Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying », *Food Hydrocoll.*, vol. 21, n° 7, p. 1223-1228, 2007.
- [232] B. Shu, W. Yu, Y. Zhao, et X. Liu, « Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying », *J. Food Eng.*, vol. 76, n° 4, p. 664-669, 2006.
- [233] C. S. Favaro-Trindade, A. S. Santana, E. S. Monterrey-Quintero, M. A. Trindade, et F. M. Netto, « The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate », *Food Hydrocoll.*, vol. 24, n° 4, p. 336-340, 2010.
- [234] G. K. Bédié, S. L. Turgeon, et J. Makhlouf, « Formation of native whey protein isolate–low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods », *Food Hydrocoll.*, vol. 22, n° 5, p. 836-844, 2008.
- [235] S. Drusch, Y. Serfert, A. Berger, M. Q. Shaikh, K. Rätzke, V. Zaporojtchenko & K. Schwarz, K. « New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein », *Food Hydrocoll.*, vol. 27, n° 2, p. 332-338, 2012.
- [236] M. I. Ré, « Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying », *Dry. Technol.*, vol. 24, n° 4, p. 433-446, 2006.
- [237] S. Abbas, C. D. Wei, K. Hayat, et Z. Xiaoming, « Ascorbic Acid: Microencapsulation Techniques and Trends—A Review », *Food Rev. Int.*, vol. 28, n° 4, p. 343-374, 2012.
- [238] M. L. Bruschi, M. L. C. Cardoso, M. B. Lucchesi, et M. P. D. Gremião, « Gelatin microparticles containing propolis obtained by spray-drying technique: preparation and characterization », *Int. J. Pharm.*, vol. 264, n° 1, p. 45-55, 2003.
- [239] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, et R. Saurel, « Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview », *Food Res. Int.*, vol. 40, n° 9, p. 1107-1121, nov. 2007.
- [240] R. Murugesan et V. Orsat, « Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients—A Review », *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, n° 1, p. 3-14, 2012.

- [241] N. E. Rocha-Guzmán *et al.*, « Effect of High-Pressure Homogenization on the Physical and Antioxidant Properties of *Quercus resinosa* Infusions Encapsulated by Spray-Drying », *J. Food Sci.*, vol. 75, n° 5, p. N57-N61, 2010.
- [242] A. Nesterenko, I. Alric, F. Violleau, F. Silvestre, et V. Durrieu, « The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process », *Food Hydrocoll.*, vol. 41, p. 95-102, 2014.
- [243] S. Ray, U. Raychaudhuri, et R. Chakraborty, « An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology », *Food Biosci.*, vol. 13, p. 76-83, 2016.
- [244] N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, R. F. González-Laredo, F. Harte, L. Medina-Torres, L.A. Ochoa-Martínez & M. Soto-García Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying: Characterization and oxidative stability studies », *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 104, p. 1986-1995, 2017.
- [245] P. Robert, T. Gorena, N. Romero, E. Sepulveda, J. Chavez, et C. Saenz, « Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying », *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 45, n° 7, p. 1386-1394, 2010.
- [246] F. P. Flores, R. K. Singh, et F. Kong, « Physical and storage properties of spray-dried blueberry pomace extract with whey protein isolate as wall material », *J. Food Eng.*, vol. 137, p. 1-6, 2014.
- [247] J. R. da Rosa, L. G. Nunes, M. H. Motta, J. P. Fortes, G. C. C. Weis, L.H. R. Hecktheuer & C. S. S. da Rosa, « Microencapsulation of anthocyanin compounds extracted from blueberry (*Vaccinium* spp.) by spray drying: Characterization, stability and simulated gastrointestinal conditions », *Food Hydrocoll.*, vol. 89, p. 742-748, 2019.
- [248] K. Papoutsis, J. Golding, Q. Vuong, P. Pristijono, C. Stathopoulos, C. Scarlett & M. Bowyer, « Encapsulation of Citrus By-Product Extracts by Spray-Drying and Freeze-Drying Using Combinations of Maltodextrin with Soybean Protein and ι-Carrageenan », *Foods*, vol. 7, n° 7, p. 115, 2018.
- [249] L. C. Corrêa-Filho, S. C. Lourenço, D. F. Duarte, M. Moldão-Martins, et V. D. Alves, « Microencapsulation of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Pomace Ethanolic Extract by Spray Drying: Optimization of Process Conditions », *Appl. Sci.*, vol. 9, n° 3, p. 612, 2019.
- [250] E. González, A. M. Gómez-Caravaca, B. Giménez, R. Cebrián, M. Maqueda, A. Martínez-Férez & P. Robert « Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion », *Food Chem.*, vol. 279, p. 40-48, 2019.
- [251] F. de J. Bonilla-Ahumada, S. Khandual, et E. del C. Lugo-Cervantes, « Microencapsulation of algal biomass (*Tetraselmis chuii*) by spray-drying using different encapsulation materials for better preservation of beta-carotene and antioxidant compounds », *Algal Res.*, vol. 36, p. 229-238, 2018.
- [252] W. Shao, X. Pan, X. Liu, F. Teng, et S. Yuan, « Microencapsulation of Algal Oil Using Spray Drying Technology », *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 56, n° 1, p. 65-70, 2018.
- [253] P. Bikker, M. M. van Krimpen, P. van Wikselaar, B. Houweling-Tan, N. Scaccia, J. W. van Hal & A. M. P. Bikker, M. M. van Krimpen, P. van Wikselaar, B. Houweling-Tan, N. Scaccia, J. W. van Hal & A. M. López-Contreras, « Biorefinery of the green seaweed *Ulva lactuca* to produce animal feed, chemicals and biofuels », *J. Appl. Phycol.*, vol. 28, n° 6, p. 3511–3525, 2016.

- [254] B. R. Parjikolaie, L. C. Cardoso, M. T. Fernandez-Ponce, C. M. Serano, A. Bruhn, K. V. Christensen & X. C. Fretté, « Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Ulva lactuca* (Chlorophyta). », *Planta Medica*, 80(16), P1N26., 2014.
- [255] S. Bhagavathy, P. Sumathi, et I. Jancy Sherene Bell, « Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity », *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 1, n° 1, Supplement, p. S1-S7, 2011.
- [256] M. Farasat, R.-A. Khavari-Nejad, S. M. B. Nabavi, et F. Namjooyan, « Antioxidant properties of two edible green seaweeds from northern coasts of the Persian Gulf », *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 8, n° 1, p. 47, 2013.
- [257] A. Alves, R. A. Sousa, et R. L. Reis, « A practical perspective on ulvan extracted from green algae », *J. Appl. Phycol.*, vol. 25, n° 2, p. 407–424, 2013.
- [258] W. Piang-Siong, *Etude des propriétés de l'acide aconitique et des dérivés obtenus par transformations chimiques*, Thèse de l'Université de La Réunion, 2011.

Annexe

ANNEXE 1 : Fiche technique des algues sèches *Ulva lactuca* importées de Chine

Wholesale Food/Feed Grade Ulva Powder Dried Seaweed Powder/Flakes in Fujian China

Food Ulva Powder

The Ingredients of the Green type: (unit: 100g contains)

Ash	≤30%	Natrium	200-350mg	Seaweed gel	≥12%
moisture	<12%	Magnesium	0.5mg	Protein	≥8%
Salinity	<7%	Ca	300mg -380mg	Fucoidan	3%
Fibre	≤6%	Phosphorus	200-550 mg	Amino	30%-45%
Carotene	600mg-1000 mg	Iron	10mg-22mg	Anti-cyclic blood acid	>1000mg
Mannitol	5%-12%	Manganese	22mg	Fat	1%-2%
The degree of fineness	80-100 mesh	Iodine	5mg -15mg	EPA	0.5%-1%

Specifications: 20-40 kg Plastic woven sack packaging

Storage: stored in cool, dry place at room temperature to maintain 12 months

Feed Ulva Powder

Ingredients:

Crude Ash≤30%	Phosphorus:2000mg/kg-5500mg/kg
Protein≥8%	Iodine:50 mg/kg-150mg/kg
Moisture<12%	Iron:100mg/kg -220mg/kg
Seaweed gel≥12%	Carotene:6000mg-10000mg/kg
Fibers≤13%	Anti-cyclic blood acid>10000mg/kg
Fucoidan:3%	Manganese:220mg/kg
Amino:30%-45%	Ca:3000mg/kg-3800mg/kg
Mannitol:5%-12%	Natrium:2000-3500mg/kg
Salinity:≤10%	Magnesium:5mg/kg
Fat: 1%-2%	

ANNEXE 2: Protocoles d'analyse

Fatty acid analysis by Gas Chromatography (GC)

The ethyl acetate extracts of *Ulva lactuca* and *Spinacia oleracea* were analyzed by an external calibration method, using a Varian 3900 gas chromatograph equipped with an automatic sample changer. The capillary column was: Agilent, Select FAME, 50 m × 0.25 mm × 0.25 μm. The method of chemical derivation is based on transesterification of fatty acids to fatty acid methyl esters (FAMES): 20 mg of the sample was diluted with 1 mL of TBME (tert-butyl methyl ether), and then 100 μL of this solution was added to the vial with 50 μL TMSH (0.5 M methylene chloride in trimethylsulphonium hydroxide). The helium gas flow rate was 1.2 mL.min⁻¹. The injection of 1 μL of the sample was carried out in Split mode (1/100). The temperature program used was 185 °C for 40 minutes, followed by a gradient of 15 °C.min⁻¹ up to 250 °C. The temperature of 250 °C was maintained for 10.68 min. Both the injector and the FID detector were heated to 250 °C.

Total Phenolic Content

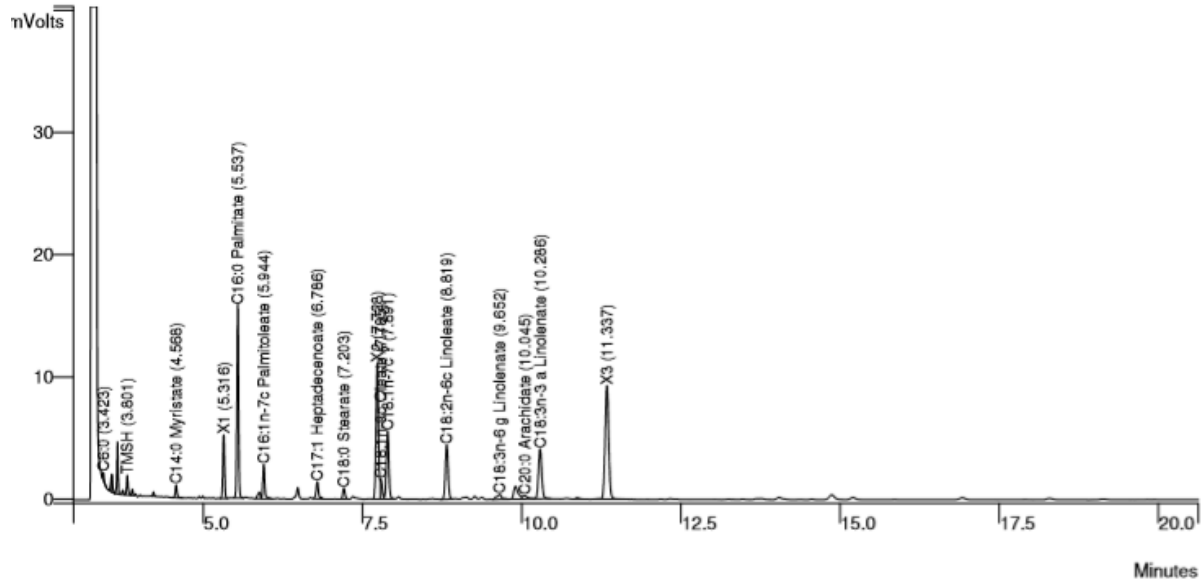
Total phenolic contents of the filtrates was determined using Folin Ciocalteu method as follows: 20 μL of filtrates, 10 μL of Folin Ciocalteu reagent and 170 μL of sodium carbonate solution (2.36 %) were added in a 96-well microplate. After 45 min of incubation at 45 °C, the absorbance was measured at 760 nm with a spectrophotometer (Spectrostar, BMG Labtech). Standard solutions of gallic acid were used to build the calibration curve. Each sample was analyzed in 4 wells. Results were expressed as gram of gallic acid equivalent per 100 g of sample dry basis (GAE/100g d.b.)

Soluble Protein analysis

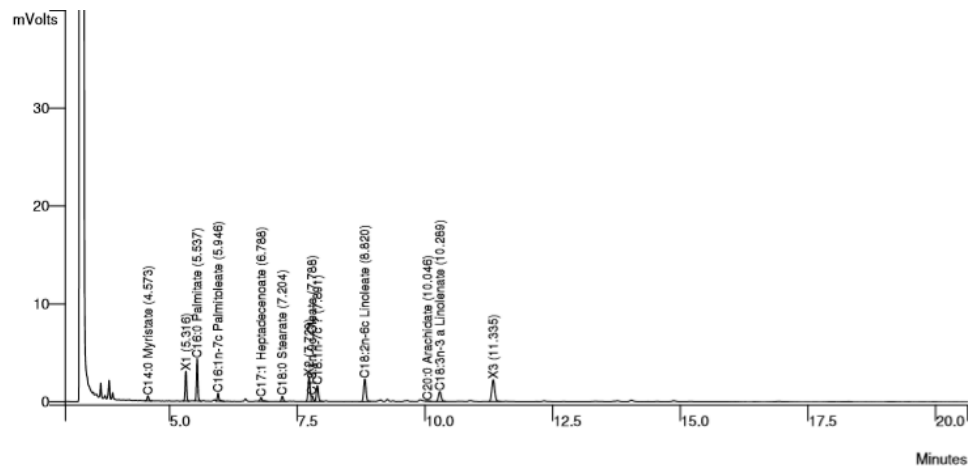
Proteins were quantified by Lowry method (Lowry et al., 1951) using a standard curve of bovine serum albumine (BSA) and a lowry kit (Lowry reagent, bovine albumin standard and 2-N Folin-Ciocalteu reagents) purchased from Thermo Fisher Scientific. A calibration curve was prepared using a concentration range of bovine standard albumin from 0 to 1, 500 μg mL⁻¹. An amount of 0.2 mL of each standard and sample containing the crude protein extract was withdrawn. One milliliter of modified Lowry reagent was added to each sample. They were then vortexed and incubated for exactly 10 min. After incubation, 100 μL of Folin -Ciocalteu reagent (1 N) was added and again vortexed and incubated for 30 min. The blue-colored solution was then measured at 750 nm with a UV-1800 Shimadzu spectrophotometer.

ANNEXE 3 : Exemples de chromatogrammes de fractions lipidiques de l'*Ulva lactuca*.

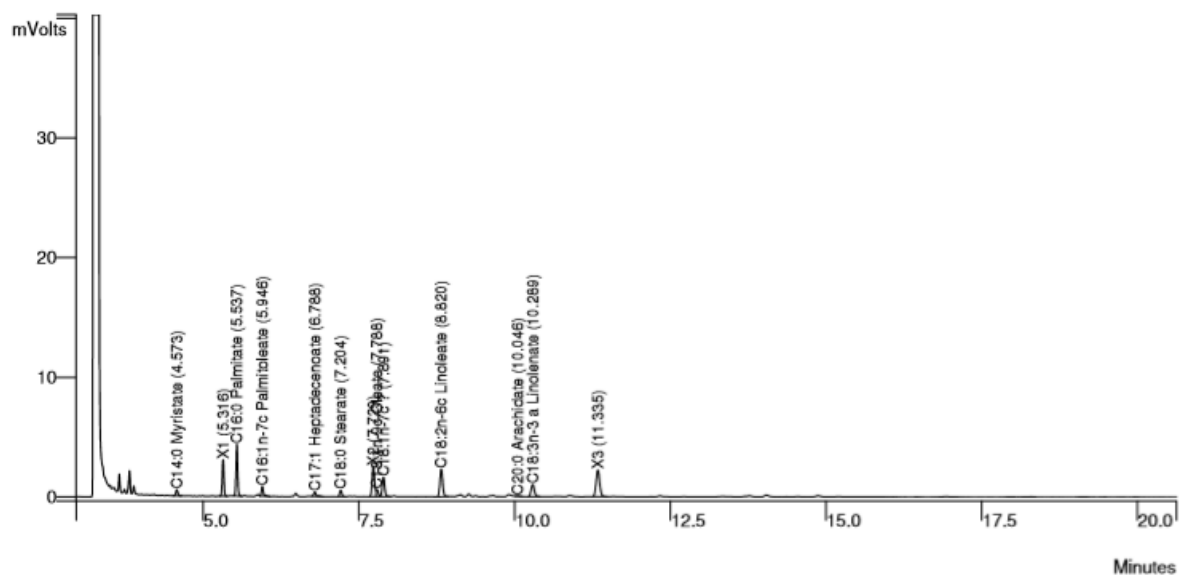
Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle de Chinese Feed powder *Ulva lactuca*



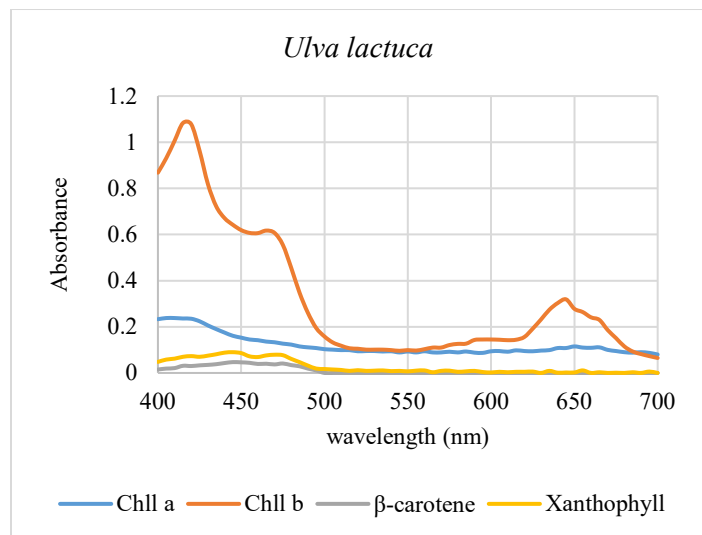
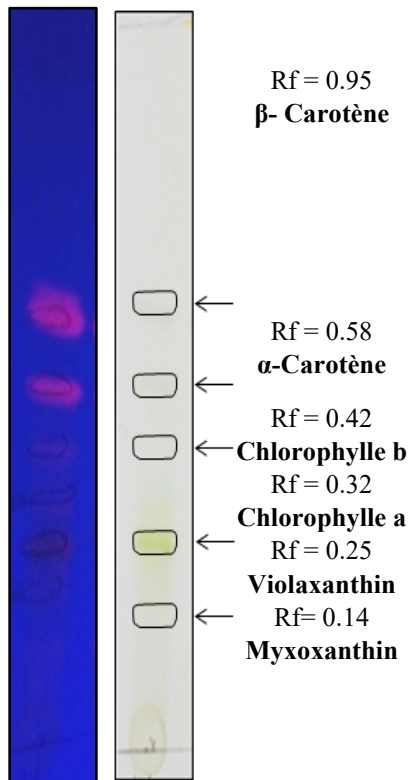
Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle Lebanese *Ulva lactuca*



Chromatogramme de l'extrait à l'acétate d'éthyle Chinese Feed powder *Ulva lactuca*



ANNEXE 4: Profil de CCM des extraits acétoniques de l'algue *Ulva lactuca*.



ANNEXE 5: Composition des sucres dans les ulvanes d'*Ulva lactuca*

		Amount (mg.L ⁻¹)					
		Rhamnose	Galactose	Glucose	Xylose	Glucuronic acid	Iduronic acid
Lebanese <i>Ulva lactuca</i>		19.2 ± 1.1	1.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.5 ± 0,3	16.2 ± 0.5	5.1 ± 0.1
Chinese	Food powder	0.3 ± 0.0	4.1 ± 0.3	1.1 ± 0.0	1.2 ± 0,1	8.2 ± 0.3	0.4 ± 0.0
<i>Ulva lactuca</i>	Feed powder	0.4 ± 0.0	5.1 ± 0.5	1.5 ± 0.0	0.7 ± 0,1	8.1 ± 0.2	0.2 ± 0.0

Values are expressed as the mean of three measurements ± SD.