

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

RAPPORT D'ETUDE

Activité	Nom/fonction	Date
Rédaction	Partie 3.1.1 Laura Lallemand (BIO'R) Partie 3.1.2 Jimmy Chane-Ming / Jennyfer Yong-Sang (UA) Partie 3.2 Céline Frechina/Laura Lallemand (Bio'R) Partie 3.3 Céline Frechina (Bio'R)	Version finale du 31/01/2020
Approbation	Maya Cesari/directrice scientifique	
Diffusion	Personnes impliquées dans le projet au CYROI et Partenaires	

Personnes impliquées dans le projet au CYROI :

- Directrice scientifique : Maya CESARI
- Unité BIO'R : Céline FRECHINA (CF), Laura LALLEMAND (LL)
- Unité Analytique (UA) : Jimmy CHANE-MING (JC), Jennyfer YONG-SANG (JY)

Partenaires :

- UMR QualiSud - CIRAD : Mathieu WEIL (MW)
- Université de Tananarive : Danielle RAKOTO, Noelinirina RAHARISOA

Les contributions sont désignées dans le rapport par les noms d'unités ou les initiales des personnes intéressées

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

Table des matières

Contexte de l'étude.....	1
3.1.1 Extraction.....	2
3.1.1.1 Matériel végétal et codes échantillons	4
3.1.1.2 Références commerciales de poivre noir	5
3.1.1.3 Broyage	6
3.1.1.4 Mesure de la teneur en eau et matières volatiles	8
3.1.1.5 Extraction : hydrodistillation par chauffage classique ou micro-onde.....	11
3.1.1.6 Transmission des échantillons.....	16
3.1.2 Etude de la qualité.....	17
3.1.2.1 Composition des huiles essentielles de graines et de feuilles des poivres sauvages et noirs.....	18
3.1.2.2 Etude de la composition chimique de l'espace de tête (Headspace statique) des graines et des feuilles des poivres sauvages.....	51
3.2 Tests d'efficacité	60
3.2.1 Introduction	61
3.2.2 MATERIELS ET METHODES	63
• Modèles biologiques tests <i>in-vitro</i> cellulaires	63
• Test <i>in-vitro</i> acellulaire	64
• Composés testés	65
• Protocoles	68
• Traitement des données	70
3.2.3 RESULTATS	72
• Validation des contrôles sur A549-D	72
• Résultats des huiles essentielles sur A549-D	72
• Validation du contrôle antimicrobien.....	74
• Résultats des huiles essentielles sur micro-organismes	74
• Validation de la référence Trolox.....	76

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

- Résultats des huiles essentielles 76
- 3.2.4 CONCLUSION 77
- Données complémentaires 3.2.A Tableau des valeurs et observations test anti-inflammatoire 78
- Données complémentaires 3.2.B Tableaux des valeurs CMI et CMB 79
- Données complémentaires 3.2.C Tableaux des valeurs de pourcentage d'inhibition du DPPH 80
- 3.3 Test de cytotoxicité des huiles essentielles sur cellules humaines 81**
 - 3.3.1 Introduction 82
 - 3.3.2 MATERIELS ET METHODES 84
 - Modèle biologique tests *in-vitro* cellulaires 84
 - Composés testés, tests de cytotoxicité..... 84
 - Choix du contrôle positif, tests de cytotoxicité 85
 - Protocoles 85
 - Traitement des données, tests de cytotoxicité 87
 - 3.3.3 RESULTATS 88
 - Validation des contrôles sur A549-D 88
 - Résultats des huiles essentielles sur les A549-Dual 89
 - Validation des contrôles sur A549-D 90
 - Résultats des huiles essentielles sur les A549-Dual 91
 - 3.2.4 CONCLUSION TESTS CYTOTOXIQUES 92
 - Données complémentaires 3.3.A Tableau des valeurs et observations test anti-inflammatoire 93
 - Données complémentaires 3.3.B Tableau des valeurs et observations test anti-inflammatoire 94

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

Contexte de l'étude

L'étude réalisée par le CYROI sur les poivres sauvages de l'Océan indien répond à la section A1.4.3 de la fiche action du projet INTERREG-V Qualinnov II 2018 – 2019 (version V27) qui s'articule selon la structure suivante :

- A1.4 : Poivres Sauvages : Caractérisation, authentification, amélioration des produits et des procédés
- A1.4.1 : Mise en œuvre d'un guide de bonnes pratiques de production et transformation du Poivre
- A1.4.2 : Caractérisation de la qualité et authentification des poivres malgaches, réunionnais et Comoriens

• **A1.4.3 : Étude des possibilités de valorisation des produits et coproduits**

Les travaux de CYROI se sont déroulés en 3 phases :

3.1. Etude des rendements et de la qualité d'extraction de l'huile essentielle par différents systèmes (BIO'R et UA)

- 3.1.1 : Production des huiles essentielles (HE) et étude des rendements d'extraction, LL
- 3.1.2 : Caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles (HE) et des espaces de tête (HS) des Poivres sauvages de Madagascar et des Comores, du *Piper borbonense* (La Réunion), du *Piper nigrum* (Madagascar), JC/JY

3.2. Tests d'efficacité antimicrobienne, antioxydante et anti-inflammatoire pour comparaison des HE des différents poivres sauvages vs huile essentielle témoin (BIO'R)

- Tests antimicrobien et anti-inflammatoire, CF
- Test antioxydant, LL

3.3. Tests de cytotoxicité des huiles essentielles sur lignée cellulaire (BIO'R)

- Test de cytotoxicité, CF

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

3.1.1 EXTRACTION

Production des huiles essentielles (HE) et étude des rendements d'extraction des graines et feuilles de poivriers sauvages de Madagascar et des Comores, du *Piper borbonense* de La Réunion et du *Piper nigrum* en référence

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

Cette partie du rapport concerne l'étude des rendements de différents systèmes d'extraction de l'huile essentielle des différents poivres sauvages (feuilles et graines) et de la référence graines de poivre noir (*P. nigrum*) commerciale mieux décrite dans la littérature scientifique à la fois en termes de composition et d'activité biologique.

Ces manipulations ont été menées avec l'objectif de produire les huiles essentielles (HE) en quantités nécessaires pour les analyses prévues. Les résultats de rendement d'extraction sont exprimés en % (soit g HE/100g de biomasse sèche BS) et de teneurs en eau et matières volatiles en % (g/100g BS). Les cinétiques d'extraction ont été suivies lorsque cela a été techniquement possible.

Plusieurs stagiaires ont été impliqués occasionnellement sur cette partie :

- Arthur Ozoux, stagiaire de Master 2 Valorisation des Ressources Naturelles, Université de La Réunion
- Mounah Liachorote, stagiaire DUT Génie Biologique, IUT de St-Pierre
- Anne-Florence Valgresy, L1 DU PESSIP, Université de La Réunion

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

3.1.1.1 Matériel végétal et codes échantillons

La phase de collecte et de pré-traitement des lots de matériel végétal a été gérée par MW (détails dans un fichier qui sera à joindre).

Les lots de feuilles et de graines ont été stockés dans une pièce climatisée à l'abri de la lumière après les étapes d'égrappage et de conditionnement en sac sous vide réalisées par MW. La matière végétale a été récupérée le vendredi 22 mars 2019 à l'UMR QualiSud à St-Pierre et ramenée au CYROI (LL). Les lots ont été pesés sans le sac sous vide dans lequel la matière était stockée.

Il y a 3 lots (selon origine/espèce), une espèce par île, on note donc par un code à 3 lettres en majuscule :

- COM pour l'espèce des Comores
- REU pour La Réunion (espèce *P. borbonicum*)
- MAD pour l'espèce de Madagascar (variété/morphotype « petits grains »)

Le compartiment végétal est codé « f » pour feuilles, « g » pour graines (ex : MAD-g, COM-f).

Un lot « Pbv-g » pour « *Piper borbonicum* vrac » a été donné par MW pour des essais préliminaires et a été utilisé pour les premiers essais d'extraction et certaines analyses.

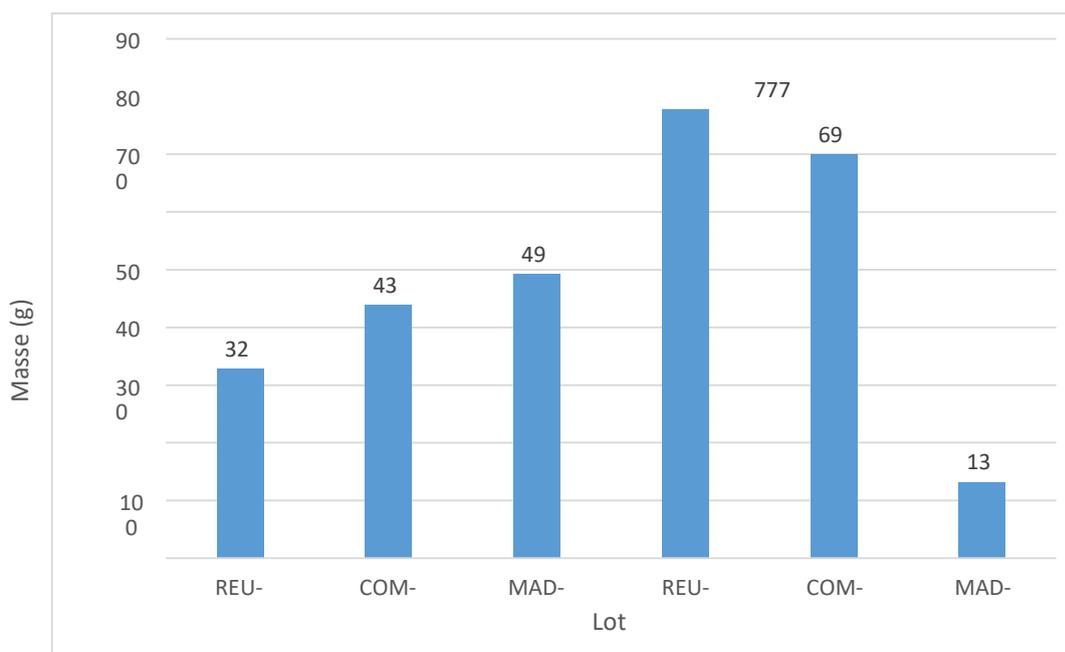


Figure 1 Quantité disponible par lot de matière première séchée

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

3.1.1.2 Références commerciales de poivre noir

La référence poivre noir (*Piper nigrum*) graines notée REF-g du commerce (Maison RAMA) est traitée comme lot de référence. Elle a été hydrodistillée dans les mêmes conditions que les lots de poivres sauvages.

Une HE témoin *Piper nigrum* Bio d'origine Madagascar produite par entraînement à la vapeur de chez Aromazone a également été analysée (<https://www.aroma-zone.com/info/fiche-technique/huile-essentielle-poivre-noir-bio-aroma-zone> (commande n°105717627)).

Référence <i>P. nigrum</i> origine inconnue	graines	REF-g	800	
Référence <i>P. nigrum</i> origine Madagascar, production BIO	HE	REF-ARZ	Plusieurs flacons de 10mL du même lot	

Figure 2 Références de poivre noir graines et HE Bio

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

3.1.1.3 Broyage

Matériel :

- Balance (50-0.01g)
- Spatules, coupelles en aluminium, pinceau
- Broyeur inox 4,5L vitesse 3000tr/min (Blixer 4 Robot-Coupe)

Le travail sur matière broyée a été privilégié pour les mesures de teneur en eau et volatiles et l'extraction d'huile essentielle afin d'améliorer le rendement et diminuer la durée d'extraction.

Le matériel végétal a donc été broyé pendant 4 x 15 secondes pour obtenir une mouture homogène (usage du bras racleur) en discontinu pour minimiser les effets de chauffage de l'appareil.

Origine, espèce	Compartiment	Code du lot	Quantité disponible (g)	Photo
Réunion <i>P. borbonense</i>	graines	REU-g	329	
Comores	Graines	COM-g	439	

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

Madagascar	graines	MAD-g	492	Photo manquante
Réunion	feuilles	REU-f	777	
Comores	feuilles	COM-f	699	
Madagascar	feuilles	MAD-f	132	

Tableau 1 Echantillons avant broyage (graines et feuilles)

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

3.1.1.4 Mesure de la teneur en eau et matières volatiles

Matériel :

- Balance de précision 0.0001g (Precisa XB 220A)
- Etuve de laboratoire réglée à 105°C (Memmert UFE400)
- Dessiccateur/humidimètre (PMB53 Adam)

Les teneurs en matière sèche (après élimination de l'eau résiduelle et des matières volatiles telles que l'huile essentielle) ont été déterminées par séchage de 5g de mouture de poivre (n=3 répétitions techniques) dans une coupelle en aluminium mise à l'étuve de laboratoire à 105°C jusqu'à masse constante.

Etapas :

- Relevé de la masse de la coupelle vide/tare (M4)
- Relevé de la masse nette de l'échantillon initial (M1), environ 5g
- Suivi de la masse coupelle + échantillon (M3) à J+1, J+4, J+5, J+6
- Calcul de la masse nette après séchage de l'échantillon $M2 = M3 - M4$.
- Calcul de la teneur en eau et volatiles TEV (%) = $(M1 - M2) / M1 * 100$
- Calcul de la teneur en matière sèche TMS (%) = $M2 / M1 * 100$

Les résultats sont exprimés en g pour 100g d'échantillon (%).

Une mesure plus rapide à l'humidimètre a été réalisée pour comparaison sur 1g (n=3) par chauffage halogène à 120°C jusqu'à stabilisation soit seulement quelques minutes.

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020



Figure 3 Coupelles de pesée avec les échantillons broyés mis à l'étuve

Résultats :

La masse sèche stabilisée à J+6 a été utilisée pour les calculs.

Lot	REU-g	COM-g	MAD-g	REU-f	COM-f	MAD-f	REF-g
Teneur en eau et volatiles (g/100g, %)	18,02	19,49	20,63	9,32	10,54	10,58	13,71

Tableau 2 Valeurs finales des teneurs en eau et matières volatiles des lots

Les lots de graines de poivres sauvages toute origine confondue présentent des teneurs plus élevées en eau et matières volatiles que les lots de feuilles (19.4% vs 10.1%), potentiellement en raison d'une richesse plus importante des graines en matières volatiles (huile essentielle), vu que le procédé de séchage des lots est *a priori* le même. Les feuilles par conséquent ont également pu perdre une partie de leur potentiel aromatique pendant l'étape de séchage.

Une différence nette entre les valeurs obtenues à l'étuve et à l'humidimètre est observée pour les graines mais pas pour les feuilles, certainement car les graines mêmes broyées renferment des cavités et porosités contenant eau et volatiles plus difficiles à libérer.

La méthode à l'humidimètre peut être utilisée pour les mesures sur feuilles car elle présente l'avantage d'être plus rapide et d'utiliser une plus petite quantité d'échantillon tout en ayant un coefficient de variation correct (<20%).

<p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
	<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>

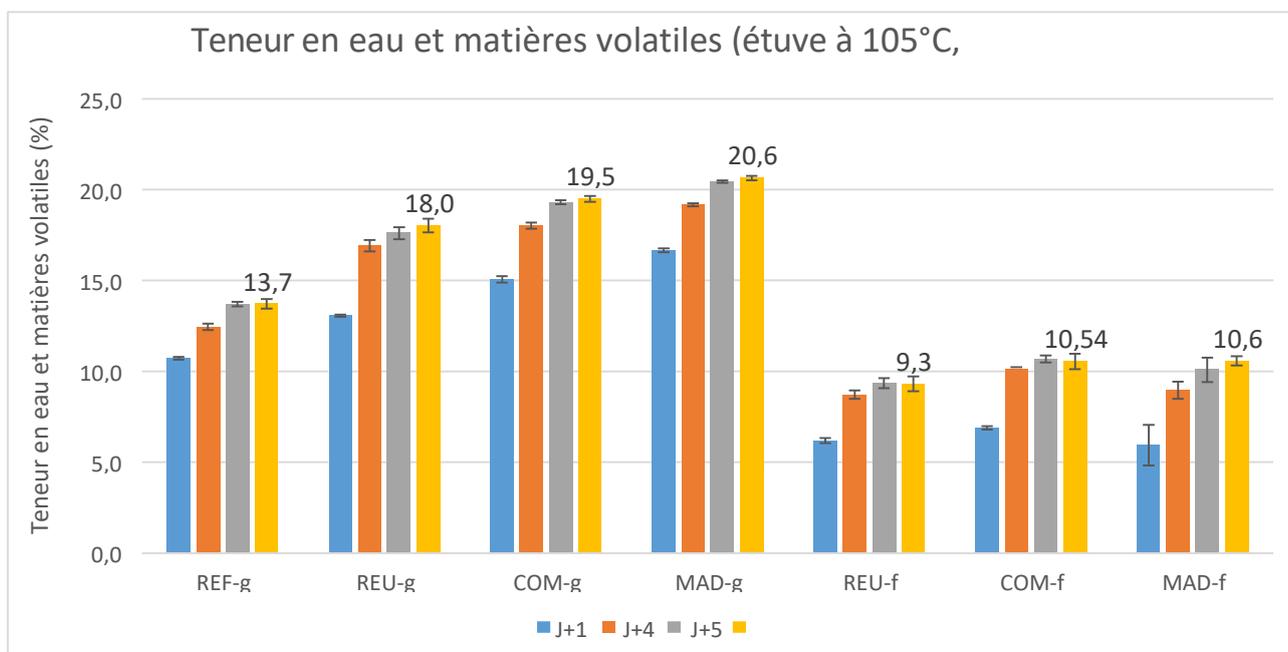


Figure 4 Evolution de la teneur en eau et matières volatiles des lots à étude

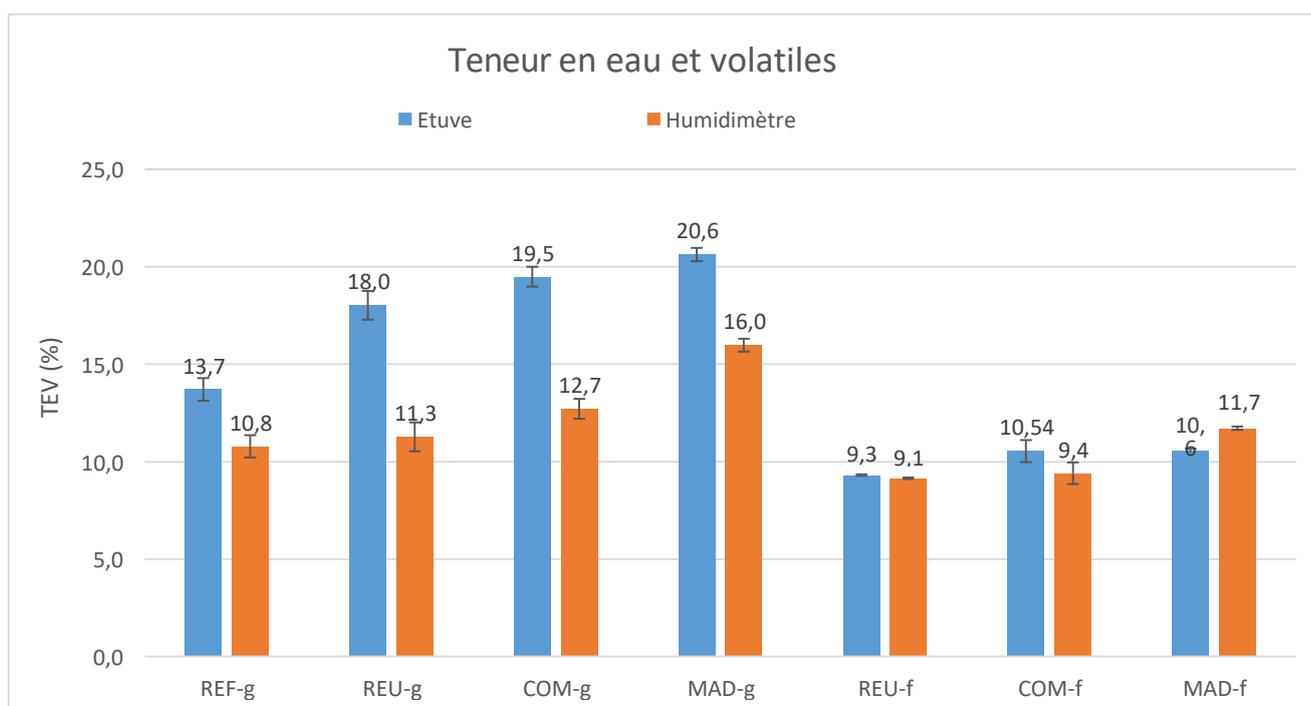


Figure 5 Teneur en eau et volatiles mesurées par la méthode conventionnelle (étuve) et une méthode rapide (humidimètre)

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

3.1.1.5 Extraction : hydrodistillation par chauffage classique ou micro-onde

Matériel :

- Plaque induction 3500W (consigne : 2100W/130°C)
- Cryothermostat (LabTech Smart H150-2100) consigne : 8°C
- Turbo distillateur/turbo extracteur d'huile essentielle (REUS, cuves de 12 et 20L)
- Extracteur micro-onde Milestone Ethos X (cuves Small et Medium)
- Condenseur en acier inoxydable et collecteur eau florale et HE en verre

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	



Figure 6 Extracteur micro-onde avec cuve en verre et support téflon (haut) ; turbo-distillateur avec cuve inox ; cryothermostat (bas)

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

L'objectif était de comparer 2 techniques :

- la technique conventionnelle d'extraction d'huile essentielle par hydrodistillation avec une plaque chauffante électrique (cuve inox)
- la technique d'extraction de la fraction volatile par chauffage micro-onde (cuve en verre).

Les mêmes systèmes de refroidissement (cryothermostat) et de condensation des vapeurs avec cohobage (type Clevenger) ont été utilisés pour les deux techniques.

Une vingtaine d'extractions a été réalisée. Les durées ont été de 6h pour l'hydrodistillation classique et 3h pour le chauffage micro-onde. Lorsque cela a été possible, 2 essais ont été réalisés par matière et par technique (quantité minimale de matière pour remplir la cuve).

Le plan d'expériences suivant a été suivi :

Lots	HD1	HD2	MO1	MO2
REU-g	80	80	100	150 (*)
COM-g	80	100	200	
MAD-g	100	100	200	
REF-g	200	200	200	200
REU-f	150	250	300	
COM-f	300 (**)		300 (**)	
MAD-f	100			

(*) lot de graines séchées de *P. borbonense* de La Réunion noté « Pbv-g » (lot en vrac issu de plusieurs collectes de 2017 et 2018 traitées par MW et données pour des tests préliminaires)

(**) cas particulier avec gros volume de feuilles

Figure 7 Plan d'expériences pour les extractions par hydrodistillation (HD) et microondes (MO) indiquant la quantité de biomasse par extraction (en g)

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

La matière broyée est mise en contact avec l'eau osmosée dans la cuve et le système est surmonté du système avec cohobage (les détails sont rapportés dans le tableau).

Technique	HD	MO
Durée (h)	6	3
Masse de plante séchée broyée introduite (g)	80 à 300g	100 à 300g
Cuve	12L (20L pour 300g de feuilles (**))	Small (Medium pour 300g de feuilles (**))
Paramètres de chauffage	2100W/130°C	

Résultats :

Globalement on note que les rendements d'extraction HD et MO sont similaires à 3h (CV<10%). La matière est initialement broyée et donc homogène et l'huile essentielle facilement extractible ; l'extraction de l'HE est rapide (environ 80% en 1h). La durée d'hydrodistillation de 6h en chauffage classique et de 3h avec microondes semble peu influencer la quantité d'HE obtenue par l'une ou l'autre méthode.

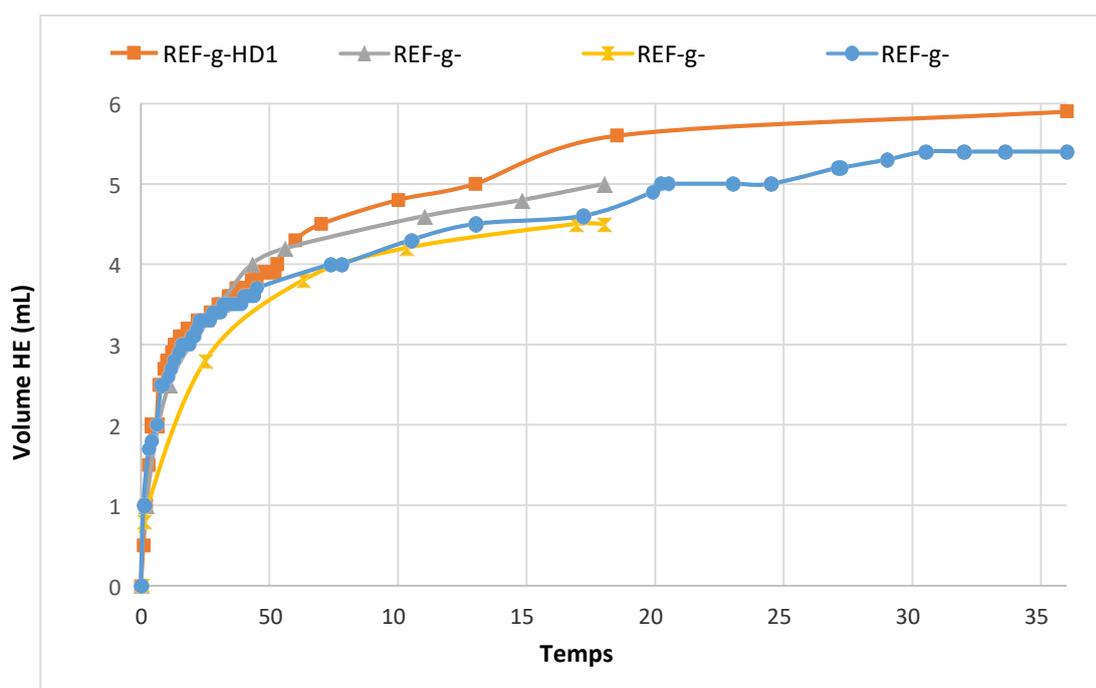


Figure 8 Cinétiques d'extraction d'HE du lot REF-g (*P. nigrum*)

<p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	Date de création : 25/04/2019
			<p>BIO.DOT.001.A</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>			

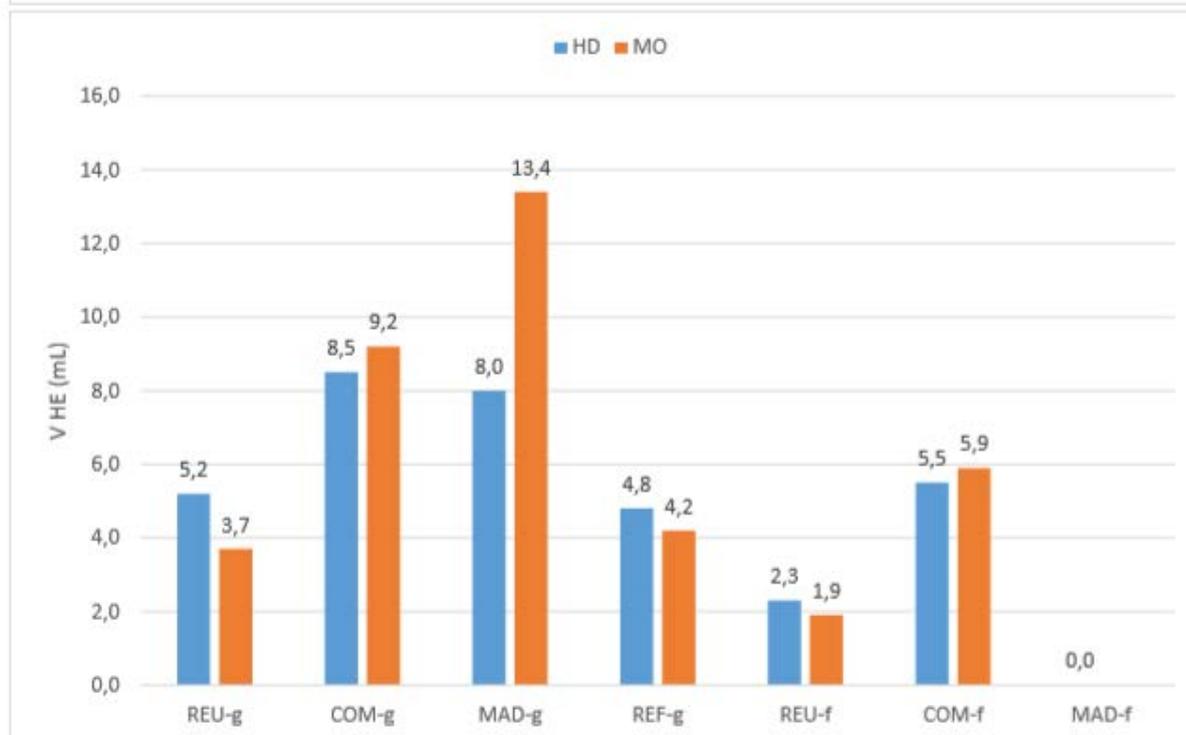
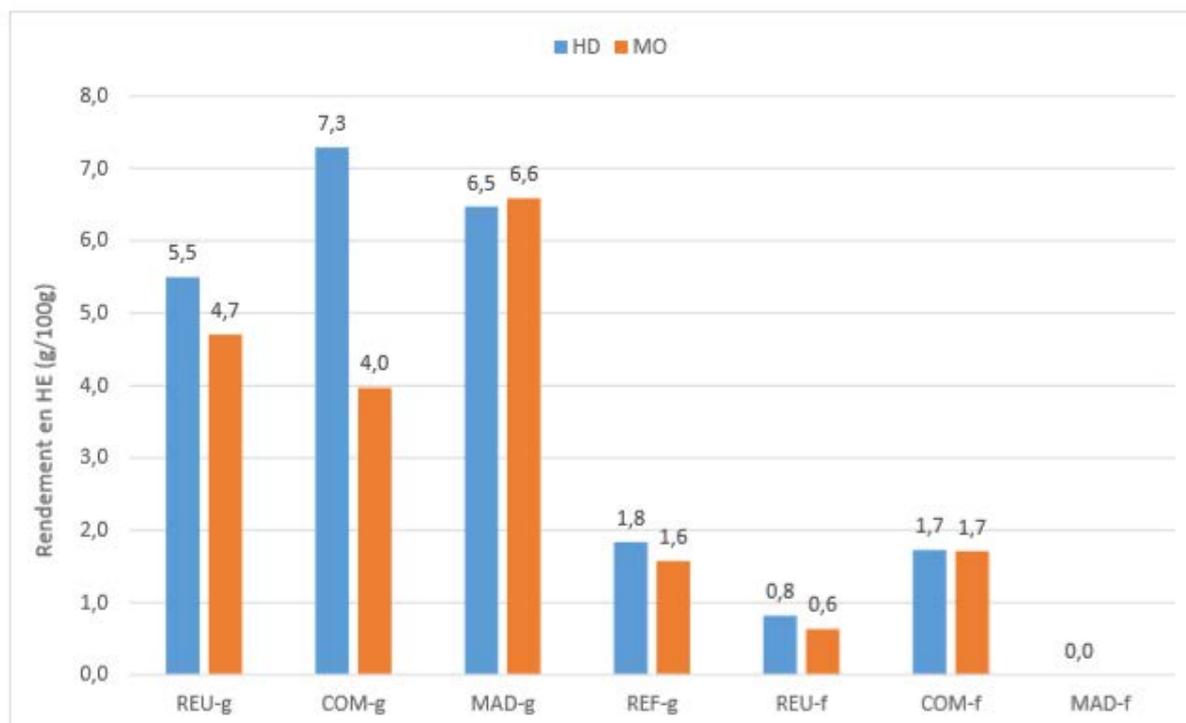


Figure 9 Rendements d'extraction (haut) et volumes d'HE (bas) obtenus selon la technique HD vs MO pour chaque lot

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

3.1.1.6 Transmission des échantillons

- En avril pour les analyses de l'espace de tête (HS) par l'Unité Analytique du CYROI :
 7 flacons de chaque biomasse sèche broyée
 - o 4g pour les graines (inclus la référence commerciale REF-g)
 - o 2g pour les feuilles car volume occupé plus important dans les flacons

Lot	MAD-f	MAD-g	COM-f	COM-g	REU-f	REU-g	REF-g
Quantité (g)	7x2g	7x4g	7x2g	7x4g	7x2g	7x4g	7x4g

- Mise à disposition en juin pour les analyses d'HE par GC-MS (UA) et pour les tests biologiques (BIO'R) :

Lot	Technique d'extraction	Volume HE (mL)	Rdt HE (% g/100g dw)	Commentaires	Nom échantillon(s) produit(s)	Analyse GC-MS (partie 3.1.2)	Tests biologiques (parties 3.2 et 3.3)
MAD-f	HD	traces	-	repris dans 1mL de n-hexane.	MAD-f-HD-Hexane	oui	-
	MO	-	-	pas assez de matière.	-	-	-
MAD-g	HD	8	6.5		MAD-g-HD	oui	oui
	MO	13.4	6.6		MAG-g-MO	oui	-
COM-f	HD	5.5	1.7		COM-f-HD	oui	-
	MO	5.9	1.7		COM-f-MO	oui	-
COM-g	HD	8.5	7.3		COM-g-HD	oui	oui
	MO	9.2	4.0		COM-g-MO	oui	-
REU-f	HD	2.3	0.8		REU-f-HD	oui	-
	MO	1.9	0.6		REU-f-MO	oui	-
REU-g	HD	3.3	5.5		REU-g-HD	oui	oui
	MO	3.7	3.1		REU-g-MO	oui	-
REF-g	HD	4.8	1.8		REF-g-HD	oui	oui
	MO	4.2	1.6		REF-g-MO	oui	-
Nombre d'échantillons à traiter						11	4

Référence commerciale : HE poivre noir Aromazone (REF-AZ) traitée en supplément lorsque possible.

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

3.1.2 ETUDE DE LA QUALITE

Caractérisation de la composition chimique des huiles essentielles (HE) et des espaces de tête (HS) des Poivres sauvages de Madagascar et des Comores, du *Piper borbonense* (La Réunion), du *Piper nigrum* (Madagascar)

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

3.1.2.1 Composition des huiles essentielles de graines et de feuilles des poivres sauvages et noirs

A) Partie expérimentale

Les analyses ont été effectuées sur une colonne capillaire ZB-5MS de dimensions suivantes : 30 m X 0.25mm (DI), et 0.25µm d'épaisseur de phase de la marque Phenomenex®.

Injection:

Volume injecté : 1µL (dilution 1/30^{ème} avec du n-Hexane)

Conditions chromatographiques utilisées :

Injecteur: Température: 250°C

Débit constant : 2.0 ml/min Hélium N60

Split flow: 40 ml/min

Split ratio: 20

Programmation de la Chromatographie Gazeuse :

Temp (°C)	Gradient (°C/min)	Pause (min)	Total (min)
50	4.0	0.00	0.00
250	0.0	5.00	55.00

Durée de l'injection : 55 minutes

Réglage du Filament en impact électronique: -70.0 V

Temperatures:

Temp. Ligne Transfer: 250°C

Temp. Source d'ions: 250°C

Ségment Full Scan Volatils

Durée: 2.50 à 55.00 minutes

Type Scan: Full

Fenêtre Masse: 41:415 Da

Type d'ionisation: EI

Paramètres Générales:

Mode du Scan: Normal

Temps du Scan: 0.2 seconds/scan
(Dwell time)

Détecteur à ionisation de flamme (FID):

Temp.: 280°C

Air : 250 ml/min

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

Hydrogène : 35 ml/min
Makeup gaz : 30 ml/min

La détection des métabolites secondaires présents dans les huiles essentielles des graines et des feuilles du poivre de Madagascar, de La Réunion et des Comores ont été effectuée par couplage de la chromatographie gazeuse (Trace 1300 de Thermo Scientific) et la spectrométrie de masse (TSQ 8000 Evo de Thermo Scientific) par l'impact Electronique (EI) positive.

Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés en se référant à leur indice de Kovats et en comparant leurs spectres de masse à ceux des composés de référence grâce à un logiciel d'aide à l'identification muni de libraires telles que NIST14, Wiley11 et FFNSC3. Les indices de Kovats de chaque composé ont été calculés par rapport aux temps de rétention de la série des alcanes linéaire C8 à C23. De plus, pour lever toutes les ambiguïtés d'identification des composés volatils (*réf. Liste I*), les spectres de masse ont été comparés aux données spectrométriques tirées de la littérature (*réf. Adams, 1995*).

B) Résultats et discussions

B.1. Composition des huiles essentielles des graines et des feuilles du poivre sauvage de Madagascar

Le mode d'acquisition sélectionné (*réf. Ségment Full Scan Volatils*) a permis de déterminer **106 composés volatils** dans l'huile essentielle de graines du poivre sauvage de Madagascar (*réf. Tableau I*), qui représentent **99.22 % de la composition** de l'huile essentielle.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

ZB-5MS		MADAGASCAR		
RT (min)	Composé	Aire (%)	KI exp.	KI théo.
5.03	Tricyclène	0.39	922	926
5.10	alpha-thujene	-	922	931
5.33	alpha-Pinene	8.56	931	939
5.68	Camphene	0.48	946	953
6.21	Verbenene	-	967	967
6.26	Sabinene	0.69	969	976
6.43	beta-Pinene	7.20	976	980
6.68	Myrcene	1.31	986	991
7.25	alpha-Phellandrene	14.69	1007	1005
7.30	Delta-3-Carene	4.20	1009	1011
7.47	alpha-Terpinene	0.05	1014	1018
7.54	ortho-Cymene	-	1016	1022
7.71	para-Cymene	2.82	1022	1026
7.85	Limonene	-	1026	1031
7.90	beta-Phellandrene (1)	9.05	1028	1031
7.94	1,8-Cineole (2)	3.73	1030	1033
8.01	cis-beta-Ocimene	0.23	1032	1040
8.32	trans-beta-Ocimene	0.16	1042	1050
8.68	gamma-Terpinene	0.09	1054	1062
9.04	trans-Sabinene hydrate	0.05	1066	1068
9.38	para-Mentha-2,4(8)-diene	0.03	1078	1086
9.51	Terpinolene	0.18	1081	1088
9.62	Fenchone	-	1085	1087
9.66	para-Cymenene	-	1086	1089
9.99	Linalool	0.89	1097	1098
10.58	exo-Fenchol	-	1115	1117
10.75	cis-para-Menth-2-en-1-ol	0.08	1120	1121
11.01	cis-Limonene oxide	-	1128	1134
11.26	trans-Pinocarveol	0.02	1136	1139
11.32	trans-para-Menth-2-en-1-ol	0.05	1138	1139
11.43	trans-Verbenol	0.04	1141	1144
11.47	Camphor	0.09	1142	1143
11.74	Camphene hydrate	-	1150	1148
11.97	Pinocarvone	0.05	1157	1162
12.28	Borneol	0.08	1167	1165
12.34	Borneol (isomère)	0.04	1169	
12.56	Terpin-4-ol	0.11	1176	1177
12.76	Cryptone	0.06	1182	1184
12.78	para-Cymen-8-ol	-	1183	1183
13.04	alpha-Terpineol	0.21	1190	1189
13.49	trans-Piperitol	0.09	1204	1205
13.79	Sabinene hydrate acetate	-	1214	1219
14.15	Thymol methyl ether	-	1225	1235
14.82	acetate Linalool **	0.05	1246	1257
14.93	Piperitone	0.26	1249	1252
15.31	3,5-dimethoxy Toluene	0.02	1260	1267
16.08	Safrole	0.23	1284	1285
16.39	Thymol	0.15	1294	1290
17.43	delta-Elementene (isomere)	-	1326	

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019	
			Date de mise à jour : 31/01/2020	
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009		BIO.DOT.001.A		

17.54	delta-Elemene	0.16	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.20	1341	1351
18.05	Eugenol	-	1346	1356
18.60	Cyclosativene	0.53	1363	1368
18.81	alpha-Copaene	0.68	1370	1376
19.04	beta-Bourbonene	0.04	1377	1384
19.20	beta-Cubebene	0.27	1382	1390
19.25	beta-Elemene	0.45	1383	1391
19.63	methyl Eugenol	0.48	1395	1401
19.77	alpha-Gurjunene	0.06	1400	1409
20.01	alpha-cis-Bergamotene	0.03	1408	1415
20.20	beta-Caryophyllene	4.48	1414	1418
20.47	beta-Gurjunene	0.37	1423	1432
20.65	alpha-Guaiene	0.28	1429	1439
21.05	Cadina-3,5-diene **	0.26	1442	
21.25	alpha-Humulene	1.29	1448	1454
21.37	allo-Aromadendrene	0.27	1452	1461
21.64	Ishwarane	0.71	1461	1458
21.77	gamma-Muurolene (isomere)	0.08	1464	1477
21.89	gamma-Muurolene	0.50	1469	1477
22.09	Germacrene D	6.63	1474	1480
22.12	Selina-4,11-diene	-	1477	1476
22.29	beta-Selinene	1.17	1482	1485
22.35	Bicyclosesquiphellandrene	0.17	1485	1489
22.50	alpha-Zingiberene (1495)+Asaricin (1500)	4.49	1490	1495
22.60	alpha-Muurolene	0.41	1492	1499
22.61	alpha-Muurolene + Asaricin	-	1500	1499
22.68	alpha-Bulnesene	0.84	1496	1505
22.82	(E,E)-alpha-Farnesene	0.26	1500	1509
22.91	beta-Bisabolene	1.20	1503	1509
23.00	gamma-Cadinene	0.10	1506	1513
23.10	Cubebol	1.72	1509	1514
23.18	delta-Cadinene	1.72	1512	1520
23.26	Myristicin	0.28	1514	1520
23.34	beta-Sesquiphellandrene	0.51	1517	1524
23.55	Cadina-1,4-diene [syn. Cubenene]	0.07	1525	1532
23.67	alpha-Cadinene	0.03	1530	1538
23.81	cis-Sesquiphellandrene hydrate	0.10	1535	1545
23.85	alpha-Calacorene	-	1535	1542
23.93	beta-Vetivenene	-	1538	1540
24.04	Elemol (1549) + Elemicin (1551)	1.17	1542	1551
24.29	Germacrene B	0.61	1551	1556
24.43	trans-Nerolidol	0.14	1555	1564
24.51	Elemicin (isomere)	0.12	1558	1551
24.83	Germacrene D-4-ol	0.93	1569	1574
24.95	Caryophyllene oxide	0.35	1573	1581
25.07	Globulol	0.11	1577	1583
25.40	Guaiol	0.13	1589	1595
25.59	Viridiflorol	0.34	1595	1590
25.73	Humulene epoxide	0.12	1600	1606

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

25.83	Rosifoliol	0.12	1605	1615
25.93	1,10-di-epi-Cubenol	0.14	1607	1614
26.00	Dill Apiole	0.08	1610	1622
26.06	10-epi-gamma-Eudesmol	0.19	1612	1619
26.27	1-epi-Cubenol	0.46	1620	1627
26.39	gamma-Eudesmol	0.17	1624	1630
26.45	alpha-Acorenol	-	1626	1630
26.57	Hinesol	0.12	1630	1635
26.67	epi-alpha-Cadinol	0.14	1634	1640
26.72	epi-alpha-Muurolol	0.19	1636	1641
26.80	tau-Cadinol	0.35	1639	1640
27.03	beta-Eudesmol	1.52	1647	1649
27.10	Selin-11-en-4-alpha-ol	0.26	1651	1652
27.27	ar-Turmerone	0.38	1656	1664
27.42	14-hydroxy-9-epi-trans-Caryophyllene **	0.27	1661	1664
27.55	Apiole	0.50	1667	1677
27.93	alpha-Bisabolol	0.43	1680	1683
28.29	beta-Turmerone (syn. Curlone)	0.13	1693	1699
34.07	methyl Palmitate	0.03	1919	1926
34.5	3E-Cembrene A	0.04	1937	1941
35.08	n-acide Hexadecanoïque	1.52	1961	1968
37.92	methyl linoleate	0.05	2083	2092
38.83	acide Linoléique	0.54	2124	2133
38.97	acide Oleique	0.30	2131	2141
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		99.22		
Terpènes hydrocarbonés (%)		50.13		
Terpènes oxygénés (%)		5.75		
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)		24.38		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		8.81		
Autres (%)		10.15		
TOTAL		99.22		

Tableau I : Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de graines de poivre sauvage de Madagascar

Le chemotype de l'huile essentielle hydrodistillée à partir des graines de poivre sauvage de Madagascar est défini par les composés majoritaires, qui sont **l'alpha-Phellandrène (14.69%)**, le **béta-Phellandrène (9.05%)**, **l'alpha-Pinène (8.56%)**, le **béta-Pinène (7.20%)** et le **Germacrène D (6.63%)**.

Il a été possible d'identifier les arylpropanoïdes présents dans l'huile essentielle de graine de poivre sauvage (*réf. Tableau I*), telles que le Dill apiole (0.08%), le Safrôle (0.23%), le Myristicine (0.28%), l'Apiole (0.50%) et de Sarisan (4.49%), également connu sous le nom Asaricin.

Le composé Rosifoliol, identifié dans l'huile essentielle de feuilles du *Pipper Longum* L. (Le D Hieu et al., 2018), a été détecté dans l'huile essentielle de graine de poivre à 0.12%.

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

MADAGASCAR

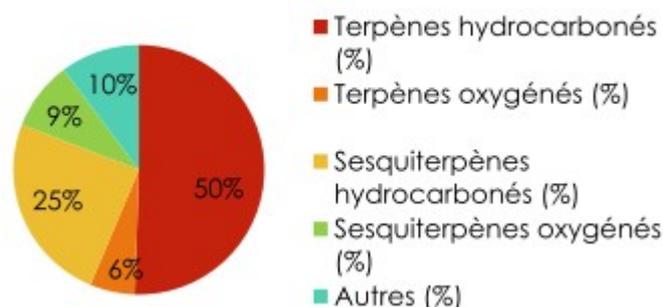


Figure I : Composition de l'huile essentielle de graines de poivre sauvage de Madagascar par fraction

Selon la Figure I, on constate que l'huile essentielle des graines de poivre sauvage de Madagascar est constituée en majeure partie de monoterpènes hydrocarbonés (50%), suivis de sesquiterpènes hydrocarbonés (25%).

Les composés oxygénés sous la forme de monoterpènes (6%) et de sesquiterpènes (9%) ne représentent que 15% de la composition totale de l'huile essentielle de graines.

L'extrait obtenu par hydrodistillation de feuilles, a permis d'identifier 69 composés aromatiques volatils. Ces molécules représentent 92.55% de la composition totale de l'huile essentielle (*réf. Tableau II*).

Les composés majoritaires de l'huile essentielle de feuilles sont le **Germacrene D4-ol (11.25%)**, l'**Asaricin (8.04%)**, le **béta-Cadinène (6.96%)**, le **béta-Elémène (6.37%)** et le **Germacrène A (5.80%)**.

Au regard des résultats du Tableau I et II, nous observons que les huiles essentielles de graines et de feuilles issues du poivre sauvage de Madagascar se différencient par leur composé majoritaire, l'alpha-Phéllandrène (14.69%) et le Germacrène D4-ol (11.25%) réciproquement.

Le composé Rosifoliol, présent dans l'huile essentielle de graines de poivre, n'a pas pu être détecté dans l'huile essentielle de feuille.

Par comparaison avec la composition de l'huile essentielle issue de graines, on observe que les arylpropanoïdes, représentés par le Safole (0.03%), le Myristicine (0.06%), le Dill apiole (1.99%) et l'Asaricin (8.04%), sont majoritairement présents dans l'huile essentielle de feuilles (*réf. Tableau II*).

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

ZB-5MS		MADAGASCAR		
RT (min)	Composé	Aire (%)	KI exp.	KI théo.
5.10	alpha-Thujene	0.02	922	926
5.28	alpha-Pinene	0.72	929	939
5.47	Tetrahydro-Citronellene	0.01	937	936
5.68	Camphene	0.02	945	953
6.24	Sabinene	0.12	968	976
6.38	beta-Pinene	0.70	974	980
6.67	Myrcene	0.36	985	991
7.15	alpha-Phellandrene	0.11	1004	1005
7.21	delta-3-Carene	0.04	1006	1011
7.67	ortho-Cymene	0.01	1021	1022
7.81	Limonene	2.04	1025	1031
7.90	1,8-Cineole ou Eucalyptol	0.30	1028	1033
8.00	cis-beta-Ocimene	0.92	1031	1031
8.31	trans-beta-Ocimene	0.13	1042	1050
9.97	Linalol	1.00	1096	1098
10.91	Isodurene **	0.01	1125	1117
13.05	Myrtenol	0.01	1191	1194
16.08	Safrol	0.03	1284	1285
16.28	methyl-Myrtenate	0.06	1290	1296
17.54	delta-Elemene	0.45	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.10	1341	1351
18.56	Cyclosativene	0.12	1362	1368
18.83	alpha-Copaene	5.17	1370	1376
19.02	beta-Bourbonene	0.31	1376	1384
19.28	beta-Elemene	6.37	1384	1391
20.15	beta-Caryophyllene	1.45	1412	1418
20.24	alpha-Ionone	0.02	1417	1426
20.47	alpha-Gurjunene	0.63	1423	1432
20.59	gamma-Elemene	0.03	1427	1433
20.83	alpha-trans-Bergamotene	0.02	1427	1436
21.06	trans-Geranylacetone	0.11	1443	1453
21.24	alpha-Humulene	1.31	1448	1454
21.38	allo-aromadendrene	0.02	1453	1461
21.43	cis-Muurolo-4(14),5-diene	0.03	1454	1460
21.76	gamma-Gurjunene	0.07	1465	1473
21.85	gamma-Muurolole	0.85	1468	1477
22.03	Germacrene D	2.57	1474	1480
22.10	Selina-4,11-diene	0.17	1476	1482

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création :
			25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009		BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour :
			31/01/2020

22.27	beta-Selinene	2.22	1481	1485
22.34	bicyclosesquiphellandrene	0.17	1484	1489
22.50	Asaricin	8.04	1490	1500
22.61	alpha-Muurolene	1.99	1493	1499
22.85	Germacrene A	5.80	1501	1503
22.99	gamma-Cadinene	0.88	1506	1513
23.11	beta-Cadinene	6.96	1510	1518
23.17	delta-Cadinene	3.84	1511	1520
23.37	6-methyl-alpha-(E)-Ionone	0.18	1519	1518
23.48	Myristicine	0.06	1525	1520
23.55	Cadina-1,4-diene	0.05	1525	1532
23.67	alpha-Cadinene	0.19	1529	1538
23.91	trans-Calamenene ***	0.30	1537	
24.03	Elemicin (1554) + Elemol (1549)	0.46	1544	1554
24.27	Germancrene B	0.20	1550	1556
24.47	trans-Nerolidol	0.54	1557	1564
24.88	Germacrene D4-ol	11.25	1570	1574
24.98	Caryophyllene oxide	0.73	1574	1581
25.20	Spathulenol	0.21	1582	1576
25.57	beta-Oplophenone	0.31	1596	1606
26.03	Dill Apiole	1.99	1612	1622
26.31	1-epi-Cubenol	4.58	1621	1627
26.57	isospathunelol	0.40	1631	1638
26.81	alpha-Muurolol	0.86	1639	1645
27.05	alpha-Eudesmol	3.12	1648	1652
28.40	acetate Caryophyllene	0.81	1697	1700
28.69	(2Z,6E)-Farnesol	0.55	1708	1697
34.99	n acide Hexadecanoïque	1.55	1958	1968
37.81	1-Octadecanol	4.51	2078	2082
38.31	Phytol***	0.91	2100	2100
TOTAL COMPOSES DETECTES (%)		100.00		
TOTAL COMPOSES NON-IDENTIFIES (%)		7.85		
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		92.15		
NBE COMPOSES IDENTIFIES		69		
Terpènes hydrocarbonés (%)		5.19		
Terpènes oxygénés (%)		1.38		
Sesquiterpènes hydrocarbonés(%)		42.27		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		25.44		
Autres (%)		17.87		
Composés Non Identifiés		7.85		

Tableau II : Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage de Madagascar

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
		Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A

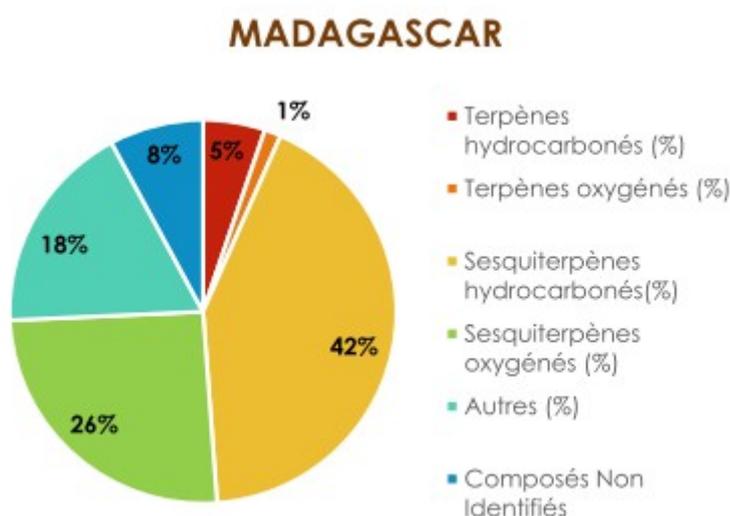


Figure II : Composition de l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage de Madagascar par fraction

Selon la Figure II ci-dessus, on constate que l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage de Madagascar est constituée à 68% de sesquiterpènes dont les sesquiterpènes hydrocarbonés à 42% et de sesquiterpènes oxygénés à 26%.

Les monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés ne représentent que 6% de la composition totale de l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage de Madagascar.

B.2. Composition des huiles essentielles des graines et des feuilles du poivre sauvage des Comores.

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de graines de poivre sauvage des Comores, nous a permis d'identifier 71 composés aromatiques volatils, qui représentent 99.20% de la composition totale de l'extrait (*réf. Tableau III*).

Les composés majoritaires de l'extrait hydrodistillé sont **le Myristicine (22.42%), le delta-3-Carène (20.02%), le Camphène (14.64%), le bêta-Sélinène (4.49%) et l'alpha-Pinène (4.12%).**

La présence des arypropanoïdes a été observée en très grande quantité dans l'extrait de graine. En particulier, le Safrole, le Myristicine, l'Asaricin, le Dill apiole et l'Apiole qui représentent 30% de la composition totale de l'huile essentielle.

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

L'huile essentielle est constituée de 47.50% de monoterpènes hydrocarbonés, de 2.95% de monoterpènes oxygénés, de 14.01% de sesquiterpènes hydrocarbonés, de 2.77% de sesquiterpènes oxygénés et de 31.97% d'autres composés (*réf. Figure III*).

On observe que les monoterpènes constituent la fraction principale de l'huile essentielle de graines de poivre des Comores avec 51% (*réf. Figure III*).

COMORES

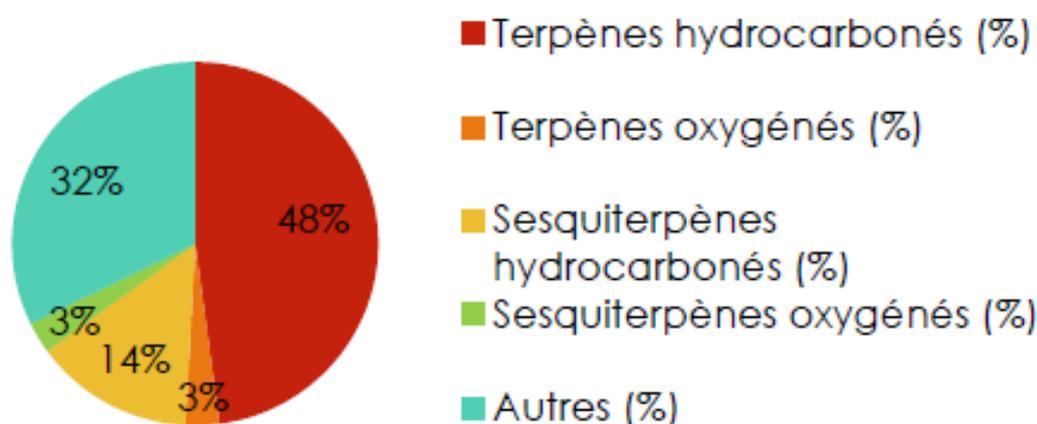


Figure III : Composition de l'huile essentielle de graines de poivre sauvage des Comores par fraction

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

ZB-5MS		COMORES		
RT (min)	Composé	Aire(%)	KI exp.	KI théo.
5.03	Tricyclène	0.07	922	926
5.33	alpha-Pinene	4.12	931	939
5.68	Camphene	14.64	946	953
6.21	Verbenene	0.16	967	967
6.26	Sabinene	0.15	969	976
6.43	beta-Pinene	0.24	976	980
6.68	Myrcene	1.76	986	991
7.30	Delta-3-Carene	20.02	1009	1011
7.47	alpha-Terpinene	0.05	1014	1018
7.54	ortho-Cymene	0.04	1016	1022
7.71	para-Cymene	2.61	1022	1026
7.85	Limonene	2.32	1026	1031
7.90	beta-Phellandrene (1)	0.71	1028	1031
7.94	1,8-Cineole (2)	0.67	1030	1033
8.32	trans-beta-Ocimene	0.06	1042	1050
8.68	gamma-Terpinene	0.13	1054	1062
9.04	trans-Sabinene hydrate	0.05	1066	1068
9.38	para-Mentha-2,4(8)-diene	0.10	1078	1086
9.51	Terpinolene	0.27	1081	1088
9.62	Fenchone	0.05	1085	1087
9.66	para-Cymenene	0.05	1086	1089
9.99	Linalool	0.24	1097	1098
10.58	exo-Fenchol	0.02	1115	1117
11.01	cis-Limonene oxide	0.03	1128	1134
11.47	Camphor	0.88	1142	1143
11.74	Camphene hydrate	0.24	1150	1148
12.28	Borneol	0.83	1167	1165
12.56	Terpin-4-ol	0.07	1176	1177
12.78	para-Cymen-8-ol	0.03	1183	1183
13.04	alpha-Terpineol	0.66	1190	1189
13.79	Sabinene hydrate acetate	0.06	1214	1219
16.08	Safrole	3.46	1284	1285
17.43	delta-Elemene (isomere)	0.03	1326	
17.54	delta-Elemene	0.46	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.14	1341	1351
18.05	Eugenol	0.05	1346	1356
18.60	Cyclosativene	0.41	1363	1368
18.81	alpha-Copaene	0.38	1370	1376
19.25	beta-Elemene	0.39	1383	1391
19.63	methyl Eugenol	0.23	1395	1401
20.20	beta-Caryophyllene	1.54	1414	1418
20.47	beta-Gurjunene	0.60	1423	1432
21.05	Cadina-3,5-diene **	0.06	1442	
21.25	alpha-Humulene	1.66	1448	1454
21.89	gamma-Murolene	0.59	1469	1477
22.09	Germacrene D	1.59	1474	1480
22.12	Selina-4,11-diene	0.19	1477	1476
22.29	beta-Selinene	4.49	1482	1485

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création :
			25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009		BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour :
			31/01/2020

22.50	alpha-Zingiberene (1495)+ Asaricin (1500)	3.43	1490	1495
22.60	alpha-Muurolene	0.11	1492	1499
22.68	alpha-Bulnesene	0.05	1496	1505
22.82	(E,E)-alpha-Farnesene	0.24	1500	1509
23.10	Cubebol	1.11	1509	1514
23.18	delta-Cadinene	0.96	1512	1520
23.26	Myristicin	22.42	1514	1520
23.55	Cadina-1,4-diene [syn. Cubenene]	0.04	1525	1532
23.85	alpha-Calacorene	0.02	1535	1542
24.04	Elemol (1549) + Elemicin (1551)	0.90	1542	1551
24.29	Germacrene B	0.06	1551	1556
24.43	trans-Nerolidol	0.06	1555	1564
24.95	Caryophyllene oxide	0.09	1573	1581
26.00	Dill Apiole	0.14	1610	1622
26.27	1-epi-Cubenol	0.24	1620	1627
26.39	gamma-Eudesmol	0.17	1624	1630
26.57	Hinesol	0.03	1630	1635
26.67	epi-alpha-Cadinol	0.05	1634	1640
26.80	tau-Cadinol	0.08	1639	1640
27.03	beta-Eudesmol	0.94	1647	1649
27.55	Apiole	0.42	1667	1677
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		99.20		
Terpènes hydrocarbonés (%)		47.50		
Terpènes oxygénés (%)		2.95		
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)		14.01		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		2.77		
Autres (%)		31.97		
TOTAL		99.20		

Tableau III : Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de graines de poivre sauvage des Comores.

Les composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage des Comores, est rassemblée dans le tableau IV.

Soixante et une molécules odorantes ont été caractérisées, représentant près de 98.43% de la composition de l'huile essentielle (*réf. Tableau IV*).

L'extrait obtenu par hydrodistillation de feuilles est composé de 19.66% de terpènes hydrocarbonés, de 7.03% de terpènes oxygénés, de 3.38% de sesquiterpènes hydrocarbonés, de 2.23% de sesquiterpènes oxygénés et de 66.13% d'autres molécules (*réf. Figure IV*).

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

ZB-5MS		COMORES		
RT (min)	Composé	Aire(%)	KI exp.	KI théo.
5.03	Tricyclene	0.05	919	926
5.10	alpha-Thujene	0.07	922	926
5.28	alpha-Pinene	3.51	929	939
5.68	Camphene	11.49	945	953
6.24	Sabinene	0.22	968	976
6.38	beta-Pinene	0.25	974	980
6.67	Myrcene	0.37	985	991
7.15	alpha-Phellandrene	0.15	1004	1005
7.21	delta-3-Carene	2.11	1006	1011
7.45	alpha-Terpinene	0.03	1014	1018
7.67	ortho-Cymene	0.45	1021	1022
7.81	Limonene	0.87	1025	1031
7.90	1,8-Cineole ou Eucalyptol	4.16	1028	1033
8.67	gamma-Terpinene	0.05	1054	1062
9.04	trans-sabinene hydrate	0.06	1066	1068
9.50	Terpinolene	0.04	1081	1088
9.61	Fenchone	0.06	1085	1087
9.97	Linalol	0.47	1096	1098
11.26	trans-Pinocarveol	0.03	1136	1139
11.48	Camphor	0.60	1143	1143
11.73	Isopulegol	0.16	1150	1146
12.30	Borneol	0.71	1168	1165
12.56	Terpin-4-ol	0.08	1176	1177
13.05	Myrtenol	0.70	1191	1194
16.08	Safrol	21.41	1284	1285
17.54	delta-Elemene	0.12	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.07	1341	1351
18.05	Eugenol	0.03	1346	1356
18.56	Cyclosativene	0.14	1362	1368
18.83	alpha-Copaene	0.31	1370	1376
19.28	beta-Elemene	0.13	1384	1391
19.69	methyl Eugenol	2.98	1397	1401
20.15	beta-Caryophyllene	0.33	1412	1418
20.47	alpha-Gurjunene	0.31	1423	1432
21.38	Croweacin***	4.81	1452	1457
21.76	gamma-Gurjunene	0.03	1465	1473
21.85	gamma-Murolene	0.10	1468	1477
22.03	Germacrene D	0.09	1474	1480

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

22.10	Selina-4,11-diene	0.05	1476	1482
22.27	beta-Selinene	1.11	1481	1485
22.50	Asaricin	2.67	1490	1500
22.61	alpha-Murolene	0.10	1493	1499
22.85	Germacrene A	0.03	1501	1503
23.05	Cubebol	0.16	1508	1514
23.17	delta-Cadinene	0.39	1511	1520
23.48	Myristicine	28.23	1525	1520
23.67	alpha-Cadinene	0.05	1529	1538
24.03	Elemicin (1554)+ Elemol (1549)	3.69	1544	1554
24.27	Germancrene B	0.02	1550	1556
24.47	trans-Nerolidol	0.05	1557	1564
24.54	Elimicin (isomere)	0.35	1560	1554
24.98	Caryophyllene oxide	0.08	1574	1581
25.20	Spathulenol	0.10	1582	1576
26.03	Dill Apiole	1.89	1612	1622
26.31	1-epi-Cubenol	0.53	1621	1627
26.40	10-epi-gamma-Eudesmol	0.15	1624	1619
26.57	isospathulenol	0.05	1631	1638
26.81	alpha-Murolol	0.16	1639	1645
27.05	alpha-Eudesmol	0.95	1648	1652
38.31	Phytol***	0.07	2100	2100
TOTAL COMPOSES DETECTES (%)		100.00		
TOTAL COMPOSES NON-IDENTIFIES (%)		1.57		
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		98.43		
NBE COMPOSES IDENTIFIES		61		
Terpènes hydrocarbonés (%)		19.66		
Terpènes oxygénés (%)		7.03		
Sesquiterpènes hydrocarbonés(%)		3.38		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		2.23		
Autres (%)		66.13		
Composés Non Identifiés		1.57		

Tableau IV : Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage des Comores

D'après les résultats du tableau III, on observe que le chemotype de l'huile essentielle de feuille est caractérisé par les cinq composés majoritaires, qui sont **le Myristicin (28.23%)**, **le Safrole (21.41%)**, **le Camphène (11.49%)**, **le Croweacin (4.81%)** et **le 1,8-Cinéole (4.16%)**.

En comparant les résultats des tableaux III et IV, on constate que la Myristicine (arylpropanoïde) est le composé majoritaire de l'huile essentielle de feuilles et de graines de poivre sauvage des Comores (*réf. Figure IV*).

Le Safrole avec une teneur de 21.41% relative dans l'HE des feuilles, est six fois moins élevé dans l'huile essentielle de graine (3.46%).

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

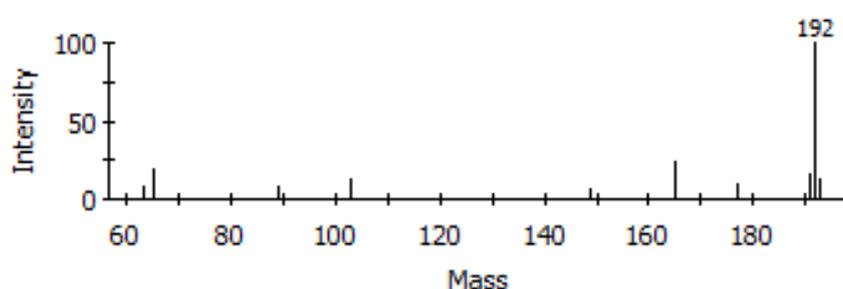
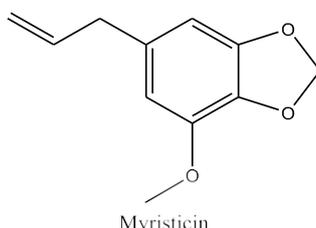


Figure IV: Spectre de masse déconvolué du Myristicin

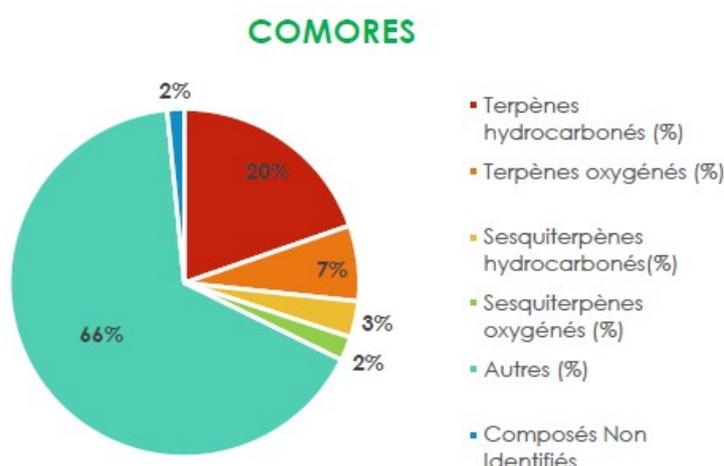


Figure V : Composition de l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage des Comores par fraction

En se référant à la figure V, on constate que l'huile essentielle de feuilles de poivre sauvage des Comores est composée de 27% de monoterpènes, de 5% de sesquiterpènes et de 66% d'autres molécules dont les arylpropanoïdes avec une teneur relative égale à 54.20%.

L'huile essentielle de feuilles se différencie de l'essence de graines de poivre sauvage des Comores, d'une part, par sa richesse en composés arylpropanoïdes (54.2% et 30% respectivement) et d'autre part, par sa faible teneur en monoterpènes hydrocarbonés (20%).

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

B.3. Composition des huiles essentielles des graines et des feuilles du poivre sauvage de La Réunion (*Piper borbonense*)

Les travaux effectués sur la composition l'huile essentielle de graines du *Piper borbonense* nous ont permis d'identifier 65 composés Ces derniers représentent 99.80% de la composition totale de l'extrait (réf. Tableau V).

Les constituants majoritaires de l'extrait obtenu par hydrodistillation de graines broyées, sont le **delta-3-Carène (27.21%)**, le **Dill Apiole (22.98%)**, l'**Asaricin (8.71%)**, le **béta-Phéllandrène (6.83%)** et le **Safrole (5.32%)**. Ensemble, ils constituent 71,05% de la composition totale de l'huile essentielle.

Parmi, les cinq composés majoritaires de l'huile essentielle, figurent trois arypropanoïdes qui sont le Dill apiole, l'Asaricin et le Safrole qui représentent 37% de la composition totale de l'huile essentielle du *Piper borbonense*.

La concentration relative du Myristicine dans l'huile essentielle est égale à 2.32%.

Béta-Caryophyllène (2.06%) et le Germacrène D (2.18%) sont les deux seuls sesquiterpènes hydrocarbonés dont la teneur relative est supérieure à 1% dans la composition totale de l'essence de graine du *Piper borbonense*.

L'huile essentielle est constituée de 46.59% de monoterpènes hydrocarbonés, de 0.96% de monoterpènes oxygénés, de 6.23% de sesquiterpènes hydrocarbonés, de 0.80% de sesquiterpènes oxygénés et de 45.22% d'autres composés (réf. Figure VI).

On observe que les monoterpènes hydrocarbonés constituent la fraction principale de l'huile essentielle de graines du *Piper borbonense* avec 47.55% (réf. Figure VI).

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

ZB-5MS		<i>Piper borbonense</i>		
RT (min)	Composé	Aire (%)	KI exp.	KI théo.
5.03	Tricyclène	0.02	922	926
5.10	alpha-thujene	0.16	922	931
5.33	alpha-Pinene	1.91	931	939
5.68	Camphene	2.83	946	953
6.26	Sabinene	2.08	969	976
6.43	beta-Pinene	1.36	976	980
6.68	Myrcene	1.61	986	991
7.30	Delta-3-Carene	27.21	1009	1011
7.47	alpha-Terpinene	0.14	1014	1018
7.71	para-Cymene	1.29	1022	1026
7.90	beta-Phellandrene (1)	6.83	1028	1031
8.01	cis-beta-Ocimene	0.22	1032	1040
8.32	trans-beta-Ocimene	0.11	1042	1050
8.68	gamma-Terpinene	0.31	1054	1062
9.04	trans-Sabinene hydrate	0.10	1066	1068
9.38	para-Mentha-2,4(8)-diene	0.09	1078	1086
9.51	Terpinolene	0.42	1081	1088
9.62	Fenchone	0.03	1085	1087
9.99	Linalool	0.14	1097	1098
10.58	exo-Fenchol	0.02	1115	1117
11.47	Camphor	0.70	1142	1143
11.74	Camphene hydrate	0.15	1150	1148
12.28	Borneol	0.04	1167	1165
12.56	Terpin-4-ol	0.15	1176	1177
13.04	alpha-Terpineol	0.24	1190	1189
14.15	Thymol methyl ether	0.02	1225	1235
14.93	Piperitone	0.09	1249	1252
16.08	Safrole	5.32	1284	1285
17.54	delta-Elemene	0.21	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.02	1341	1351
18.60	Cyclosativene	0.05	1363	1368
18.81	alpha-Copaene	0.40	1370	1376
19.20	beta-Cubebene	0.15	1382	1390
19.63	methyl Eugenol	0.10	1395	1401
20.20	beta-Caryophyllene	2.06	1414	1418
20.47	beta-Gurjunene	0.04	1423	1432
21.25	alpha-Humulene	0.28	1448	1454
21.89	gamma-Murolene	0.04	1469	1477
22.09	Germacrene D	2.18	1474	1480
22.29	beta-Selinene	0.05	1482	1485
22.61	alpha-Murolene + Asaricin	8.71	1500	1499
22.82	(E,E)-alpha-Farnesene	0.02	1500	1509
22.91	beta-Bisabolene	0.15	1503	1509
23.10	Cubebol	0.26	1509	1514
23.18	delta-Cadinene	0.14	1512	1520

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

23.26	Myristicin	2.32	1514	1520
23.34	beta-Sesquiphellandrene	0.37	1517	1524
23.93	beta-Vetivenene	0.03	1538	1540
24.04	Elemol (1549)+ Elemicin (1551)	3.91	1542	1551
24.29	Germacrene B	0.04	1551	1556
24.43	trans-Nerolidol	0.13	1555	1564
24.51	Elemicin (isomere)	0.09	1558	1551
24.83	Germacrene D-4-ol	0.03	1569	1574
24.95	Caryophyllene oxide	0.05	1573	1581
26.00	Dill Apiole	22.98	1610	1622
26.45	alpha-Acorenol	0.07	1626	1630
26.80	tau-Cadinol	0.20	1639	1640
27.10	Selin-11-en-4-alpha-ol	0.06	1651	1652
27.55	Apiole	0.11	1667	1677
34.5	3E-Cembrene A	0.05	1937	1941
35.08	n-acide Hexadecanoique	0.58	1961	1968
38.83	acide Linoleique	0.19	2124	2133
38.97	acide Oleique	0.14	2131	2141
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		99.80		
Terpènes hydrocarbonés (%)		46.59		
Terpènes oxygénés (%)		0.96		
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)		6.23		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		0.80		
Autres (%)		45.22		
TOTAL		99.80		

Tableau V : Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de graines du *Piper borbonense* (poivre sauvage de La Réunion)

Piper borbonense - REUNION

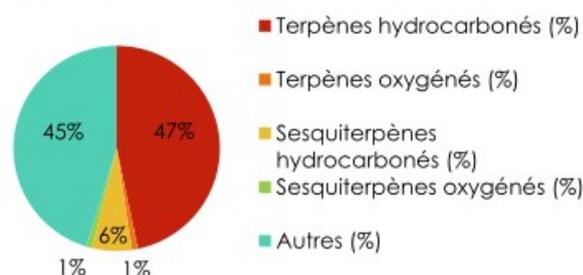


Figure VI : Composition de l'huile essentielle de graines de *Piper borbonense* par fraction

L'étude de l'huile essentielle extraite des feuilles du *Piper borbonense* a permis d'identifier 58 molécules volatiles. Elles constituent à 99.14% la composition totale de l'essence (réf. Tableau VI).

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

Les constituants majoritaires de l'extrait obtenu par hydrodistillation de graines broyées, sont le **Dill Apiole (46.93%)**, l'**Asaricin (26.97%)**, **Elemicin & Elemol (8.05%)**, le **Safrole (6.61%)** et le **Myristicine (3.74%)**. Ils constituent 71,05% de la composition totale de l'huile essentielle.

En comparant les résultats des tableaux V et VI, nous constatons que la composition de l'huile essentielle des feuilles est totalement différente de celle des graines. Les deux essences se distinguent l'une de l'autre par leur composé majoritaire. L'huile essentielle des feuilles a pour constituant majoritaire un arylpropanoïde, le Dill Apiole avec une teneur de 46.93%. Pour l'essence des graines, le composé majoritaire est un monoterpène, le delta-3-Carène avec une teneur égale à 27.21%.

ZB-5MS		REUNION		
RT (min)	Composé	Aire (%)	KI exp.	KI théo.
5.10	alpha-Thujene	0.01	922	926
5.28	alpha-Pinene	0.08	929	939
5.68	Camphene	0.03	945	953
6.24	Sabinene	0.09	968	976
6.38	beta-Pinene	0.07	974	980
6.67	Myrcene	0.04	985	991
7.15	alpha-Phellandrene	0.14	1004	1005
7.21	delta-3-Carene	0.60	1006	1011
7.45	alpha-Terpinene	0.02	1014	1018
7.67	ortho-Cymene	0.03	1021	1022
7.81	Limonene	0.10	1025	1031
7.90	1,8-Cineole ou Eucalyptol	0.03	1028	1033
8.00	cis-beta-Ocimene	0.03	1031	1031
8.67	gamma-Terpinene	0.04	1054	1062
9.50	Terpinolene	0.03	1081	1088
9.97	Linalol	0.03	1096	1098
12.56	Terpin-4-ol	0.07	1176	1177
16.08	Safrol	6.61	1284	1285
17.39	delta-Elemene (isomere)	0.09	1325	
17.54	delta-Elemene	0.23	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.06	1341	1351
18.05	Eugenol	0.19	1346	1356
18.56	Cyclosativene	0.17	1362	1368
18.83	alpha-Copaene	0.23	1370	1376
19.02	beta-Bourbonene	0.10	1376	1384

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création :	25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A

19.28	beta-Elemene	0.07	1384	1391
19.69	methyl Eugenol	0.15	1397	1401
20.15	beta-Caryophyllene	0.60	1412	1418
20.24	alpha-Ionone	0.02	1417	1426
20.47	alpha-Gurjunene	0.04	1423	1432
21.06	trans-Geranylacetone	0.08	1443	1453
21.24	alpha-Humulene	0.10	1448	1454
21.76	gamma-Gurjunene	0.06	1465	1473
21.85	gamma-Murolene	0.15	1468	1477
22.03	Germacrene D	0.21	1474	1480
22.34	bicyclosesquiphellandrene	0.06	1484	1489
22.50	Asaricin	26.97	1490	1500
22.99	gamma-Cadinene	0.06	1506	1513
23.17	delta-Cadinene	0.65	1511	1520
23.37	6-methyl-alpha-(E)-Ionone	0.09	1519	1518
23.48	Myristicine	3.74	1525	1520
23.55	Cadina-1,4-diene	0.07	1525	1532
23.91	trans-Calamenene ***	0.15	1537	
24.03	Elemicin (1554)+ Elemol (1549)	8.05	1544	1554
24.27	Germacrene B	0.03	1550	1556
24.47	trans-Nerolidol	0.21	1557	1564
24.54	Elimicin (isomere)	0.06	1560	1554
24.88	Germacrene D4-ol	0.03	1570	1574
24.98	Caryophyllene oxide	0.10	1574	1581
25.20	Spathulenol	0.10	1582	1576
26.03	Dill Apiole	46.93	1612	1622
26.40	10-epi-gamma-Eudesmol	0.31	1624	1619
27.05	alpha-Eudesmol	0.07	1648	1652
28.40	acetate Caryophyllene	0.05	1697	1700
28.69	(2Z,6E)-Farnesol	0.03	1708	1697
37.81	1-Octadecanol	0.32	2078	2082
38.31	Phytol***	0.36	2100	2100
TOTAL COMPOSES DETECTES (%)		100.00		
TOTAL COMPOSES NON-IDENTIFIES (%)		0.86		
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		99.14		
NBE COMPOSES IDENTIFIES		58		
Terpènes hydrocarbonés (%)		1.31		
Terpènes oxygénés (%)		0.13		
Sesquiterpènes hydrocarbonés(%)		3.13		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		1.00		
Autres (%)		93.57		
Composés Non Identifiés		0.86		

Tableau VI : Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de feuilles du *Piper borbonense* (poivre sauvage de La Réunion)

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

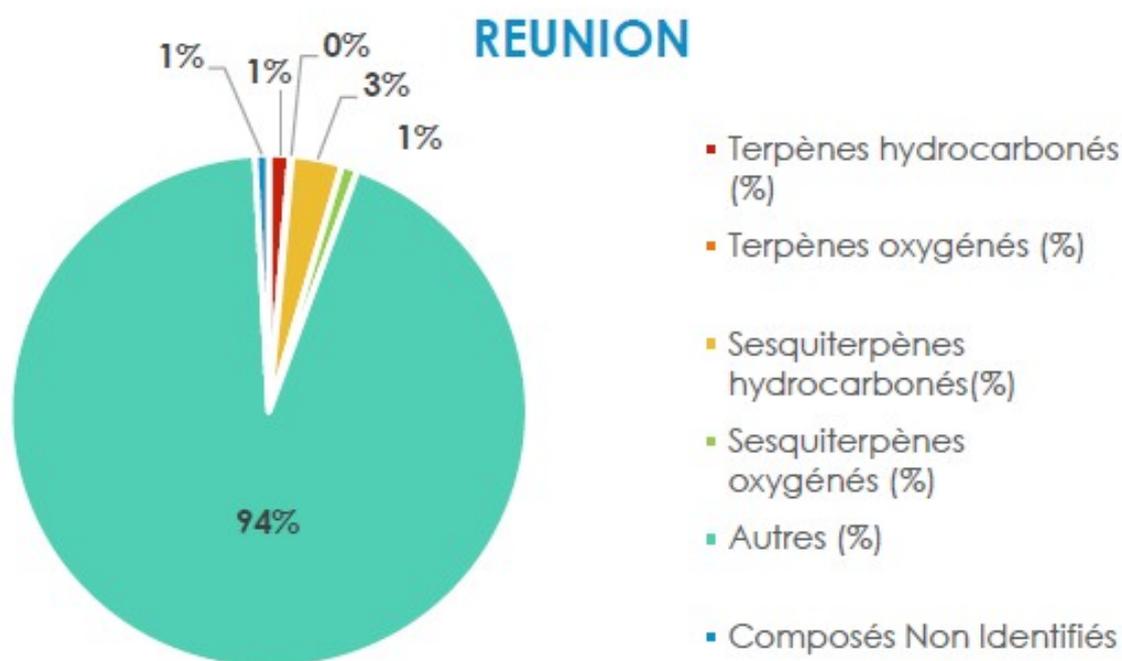


Figure VII : Composition de l'huile essentielle de feuilles de *Piper borbonense* par fraction

La figure VII nous montre que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de feuilles du *Piper borbonense* est constituée principalement de composés appartenant à la famille des arylpropanoïdes. Les monoterpènes et les sesquiterpènes identifiés dans l'huile essentielle sont très minoritaires, voire à l'état de trace comparés aux autres composés, en l'occurrence les arylpropanoïdes.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

B.4. Composition de l'huile essentielle des graines du *Piper nigrum* d'Aroma-Zone (huile essentielle de référence)

L'analyse par GC-MS de l'huile essentielle du *Piper nigrum* obtenue par hydrodistillation de graines de poivre noir biologique cultivé à Madagascar (lot 18HE0112/1-02729), a permis d'identifier 52 composés aromatiques volatils.

Les constituants majoritaires de l'essence sont le **béta-Caryophyllène (23.41%)**, le **béta-Phéllandrène & le Limonène (22.70%)**, le **delta-3-Carène (14.95%)**, le **béta-Pinène (13.40%)** et l'**alpha-Pinène (11.06%)**.

D'après les résultats du tableau VII, on constate que les arylpropanoïdes sont totalement absents dans l'huile essentielle du *Piper nigrum* commercialisée par Aromazone contrairement aux autres essences obtenues par hydrodistillation de graines de poivre sauvage de Madagascar, des Comores et de La Réunion.

ZB-5MS		AROMAZONE		
		<i>Piper nigrum</i>		
RT (min)	Composé	Aire (%)	KI exp.	KI théo.
5.10	alpha-thujene	0.05	922	931
5.33	alpha-Pinene	11.06	931	939
5.68	Camphene	0.33	946	953
6.26	Sabinene	0.33	969	976
6.43	beta-Pinene	13.40	976	980
6.68	Myrcene	2.28	986	991
7.30	delta-3-Carene	14.95	1009	1011
7.47	alpha-Terpinene	0.02	1014	1018
7.54	ortho-Cymene	0.02	1016	1022
7.71	para-Cymene	0.40	1022	1026
7.90	beta-Phellandrene + Limonene (1)	22.70	1028	1031
8.32	trans-beta-Ocimene	0.20	1042	1050
8.68	gamma-Terpinene	0.07	1054	1062
9.38	para-Mentha-2,4(8)-diene	0.17	1078	1086
9.51	Terpinolene	0.54	1081	1088
9.99	Linalool	0.27	1097	1098
11.26	trans-Pinocarveol	0.04	1136	1139
11.47	Camphor	0.03	1142	1143
11.97	Pinocarvone	0.02	1157	1162
12.56	Terpin-4-ol	0.03	1176	1177

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création :	25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A

12.76	Cryptone	0.03	1182	1184
12.78	para-Cymen-8-ol	0.02	1183	1183
13.04	alpha-Terpineol	0.18	1190	1189
13.79	Sabinene hydrate acetate	0.04	1214	1219
17.43	delta-Elemene (isomere)	0.08	1326	
17.54	delta-Elemene	1.30	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.04	1341	1351
18.60	Cyclosativene	0.17	1363	1368
18.81	alpha-Copaene	0.06	1370	1376
19.25	beta-Elemene	0.54	1383	1391
19.77	alpha-Gurjunene	0.05	1400	1409
20.20	beta-Caryophyllene	23.41	1414	1418
20.65	alpha-Guaiene	0.26	1429	1439
21.25	alpha-Humulene	1.31	1448	1454
22.09	Germacrene D	1.62	1474	1480
22.29	beta-Selinene	1.01	1482	1485
22.50	alpha-Zingiberene (1495)+ Asaricin (1500)	0.72	1490	1495
22.68	alpha-Bulnesene	0.06	1496	1505
22.82	(E,E)-alpha-Farnesene	0.29	1500	1509
23.10	Cubebol	0.10	1509	1514
23.34	beta-Sesquiphellandrene	0.19	1517	1524
24.04	Elemol (1549)+ Elemicin (1551)	0.06	1542	1551
24.29	Germacrene B	0.11	1551	1556
24.83	Germacrene D-4-ol	0.02	1569	1574
24.95	Caryophyllene oxide	0.62	1573	1581
25.73	Humulene epoxide	0.05	1600	1606
26.27	1-epi-Cubenol	0.37	1620	1627
26.45	alpha-Acorenol	0.02	1626	1630
26.57	Hinesol	0.05	1630	1635
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		99.69		
Terpènes hydrocarbonés (%)		66.52		
Terpènes oxygénés (%)		0.60		
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)		30.50		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		1.23		
Autres (%)		0.84		
TOTAL		99.69		

Tableau VII: Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de graines du *Piper nigrum* (poivre noir de Madagascar – Aromazone).

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

Piper nigrum - Aromazone

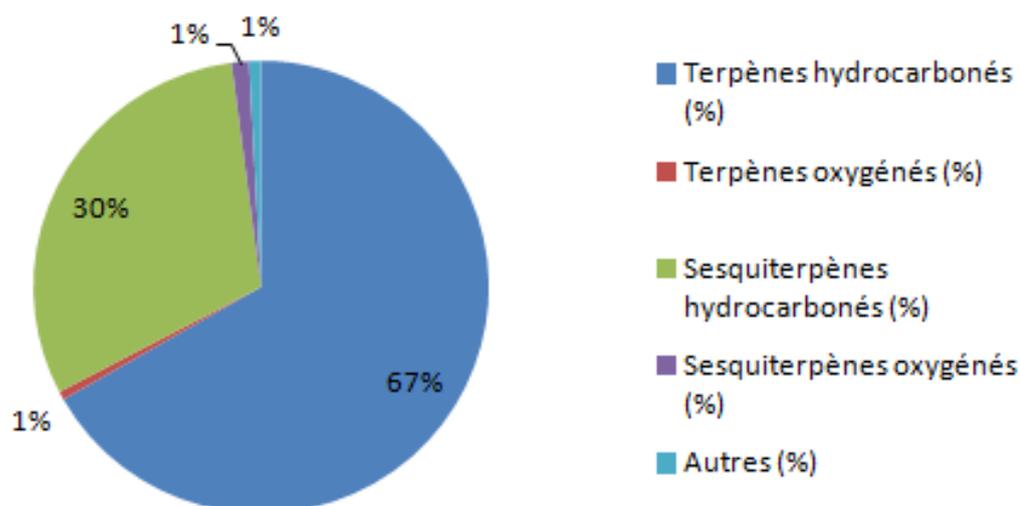


Figure VIII : Composition de l'huile essentielle de graine de *Piper nigrum* (poivre noir de Madagascar - Aromazone) par fraction

Selon la figure VIII, on constate que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de graines du *Piper nigrum* (poivre noir de Madagascar) commercialisée par Aromazone, est constituée principalement de monoterpènes et de sesquiterpènes hydrocarbonés. Les monoterpènes et les sesquiterpènes oxygénés sont quasiment minoritaires, identifiés dans l'huile essentielle sont très minoritaires, voire à l'état de trace. Comparée aux autres huiles essentielles obtenues à partir de poivres sauvages, l'essence de *Piper nigrum* fournie par Aromazone ne contient pas de composés arylpropanoïdes.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

B.5. Composition de l'huile essentielle des graines du *Piper nigrum*

L'étude de l'huile essentielle extraite des graines du *Piper nigrum* (poivre noir) a permis d'identifier 58 composés aromatiques volatils. Elles constituent à 98.95% la composition totale de l'essence (réf. Tableau VIII).

Les constituants majoritaires de l'essence obtenue par hydrodistillation de graines broyées, sont le **béta-Caryophyllène (25.99%)**, le **delta-3-Carène (25.88%)**, **1,8-Cinéole (15.88%)**, le **béta-Pinène (9.05%)** et l'**alpha-Pinène (4.74%)**. Ils constituent 81.54% de la composition totale de l'huile essentielle.

ZB-5MS		<i>Piper nigrum</i>		
RT (min)	Composé	Aire(%) / HD	KI exp.	KI théo.
5.10	alpha-thujene	0.10	922	931
5.33	alpha-Pinene	4.74	931	939
5.68	Camphene	0.11	946	953
6.26	Sabinene	0.36	969	976
6.43	beta-Pinene	9.05	976	980
6.68	Myrcene	2.28	986	991
7.30	Delta-3-Carene	25.88	1009	1011
7.47	alpha-Terpinene	0.04	1014	1018
7.54	ortho-Cymene	0.08	1016	1022
7.71	para-Cymene	1.16	1022	1026
7.94	1,8-Cineole (2)	15.88	1030	1033
8.32	trans-beta-Ocimene	0.03	1042	1050
8.68	gamma-Terpinene	0.11	1054	1062
9.38	para-Mentha-2,4(8)-diene	0.29	1078	1086
9.51	Terpinolene	0.64	1081	1088
9.99	Linalool	0.36	1097	1098
11.97	Pinocarvone	0.02	1157	1162
12.56	Terpin-4-ol	0.04	1176	1177
12.76	Cryptone	0.02	1182	1184
12.78	para-Cymen-8-ol	0.02	1183	1183
13.04	alpha-Terpineol	0.05	1190	1189
13.79	Sabinene hydrate acetate	0.04	1214	1219
17.43	delta-Elemene (isomere)	0.05	1326	
17.54	delta-Elemene	1.11	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.12	1341	1351
18.81	alpha-Copaene	1.52	1370	1376
19.25	beta-Elemene	0.75	1383	1391
20.20	beta-Caryophyllene	25.99	1414	1418
20.65	alpha-Guaiene	0.23	1429	1439
21.05	Cadina-3,5-diene **	0.02	1442	

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création :
			25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009		BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour :
			31/01/2020

21.25	alpha-Humulene	1.59	1448	1454
21.77	gamma-Murolene (isomere)	0.04	1464	1477
22.09	Germacrene D	0.13	1474	1480
22.29	beta-Selinene	1.34	1482	1485
22.50	alpha-Zingiberene (1495)+ Asaricin (1500)	1.05	1490	1495
22.82	(E,E)-alpha-Farnesene	0.35	1500	1509
23.00	gamma-Cadinene	0.05	1506	1513
23.10	Cubebol	0.61	1509	1514
23.34	beta-Sesquiphellandrene	0.28	1517	1524
23.55	Cadina-1,4-diene [syn. Cubenene]	0.02	1525	1532
23.81	cis-Sesquiphellandrene hydrate	0.02	1535	1545
24.04	Elemol (1549)+ Elemicin (1551)	0.05	1542	1551
24.29	Germacrene B	0.05	1551	1556
24.43	trans-Nerolidol	0.04	1555	1564
24.83	Germacrene D-4-ol	0.08	1569	1574
24.95	Caryophyllene oxide	0.77	1573	1581
25.73	Humulene epoxide	0.06	1600	1606
26.00	Dill Apiole	0.08	1610	1622
26.06	10-epi-gamma-Eudesmol	0.04	1612	1619
26.27	1-epi-Cubenol	0.89	1620	1627
26.45	alpha-Acorenol	0.05	1626	1630
27.10	Selin-11-en-4-alpha-ol	0.09	1651	1652
27.27	ar-Turmerone	0.03	1656	1664
27.42	14-hydroxy-9-epi-trans-Caryophyllene **	0.04	1661	1664
27.93	alpha-Bisabolol	0.04	1680	1683
38.97	acide Oleique	0.07	2131	2141
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		98.95		
Terpènes hydrocarbonés (%)		44.87		
Terpènes oxygénés (%)		16.41		
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)		33.64		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		2.76		
Autres (%)		1.27		
TOTAL		98.95		

Tableau VIII: Liste des composés volatils identifiés dans l'huile essentielle de graines du *Piper nigrum* (poivre noir du marché local – La Réunion).

En comparant les résultats des tableaux VII et VIII, nous constatons que la composition des deux huiles essentielles issues de graines du *Piper nigrum* de Madagascar (Aromazone) et du marché local de La Réunion, sont principalement constituées de monoterpènes et de sesquiterpènes hydrocarbonés, 97% et 79% réciproquement.

Les deux essences se distinguent l'une de l'autre par leur composition en molécules oxygénées. L'huile essentielle du *Piper nigrum* (marché local – La Réunion) contient environ 20% de composés oxygénés, dont 17% de monoterpènes oxygénés et 3% de sesquiterpènes oxygénés (réf. Figure IX). Et l'huile essentielle du *Piper nigrum*, commercialisée par Aromazone, ne possède que 2% de constituants oxygénés répartis en monoterpènes oxygénés à 0.60% et en sesquiterpènes oxygénés à 1.23% (réf. Figure VIII).

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

Piper nigrum - La Réunion

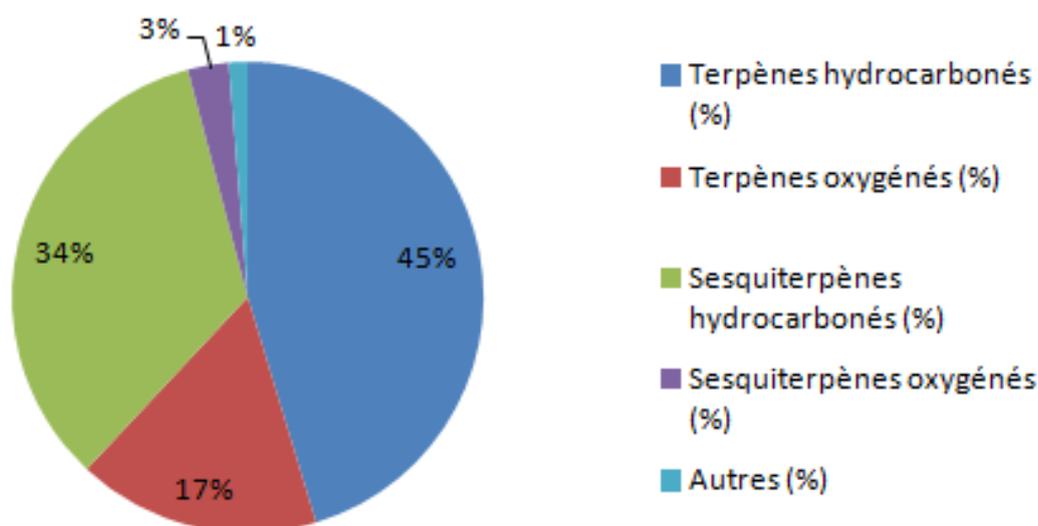


Figure IX : Composition de l'huile essentielle de graine de *Piper nigrum* (poivre noir du marché local – La Réunion) par fraction

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

C.1. Chémotypes des huiles essentielles obtenues à partir des graines

Trois chémotypes ont été caractérisés à partir de la composition des huiles essentielles obtenues à partir d'hydrodistillation de graines de poivres sauvages de Madagascar, des Comores et de La Réunion (*Piper borbonense*).

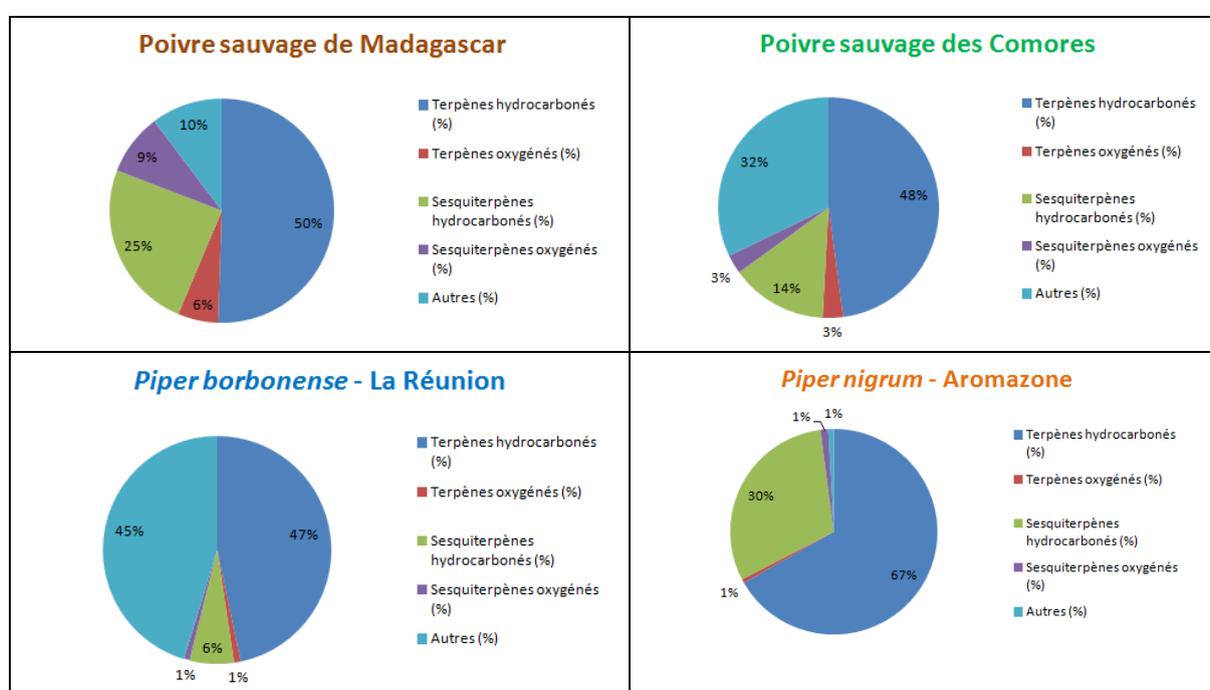


Figure X : les différents chémotypes des huiles essentielles de graines de poivres sauvages et noirs

Les trois chémotypes sont caractérisés par une très forte concentration en monoterpènes hydrocarbonés (*réf. Figure X*).

On observe que les huiles essentielles de poivres sauvages possèdent peu de sesquiterpènes hydrocarbonés comparées à l'huile essentielle de poivre noir commercialisée par Aromazone.

Le *Piper borbonense* de La Réunion se différencie des autres huiles essentielles par deux fortes proportions quasiment équivalentes de monoterpènes et de sesquiterpènes hydrocarbonés.

<p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	Date de création : 25/04/2019
			<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>

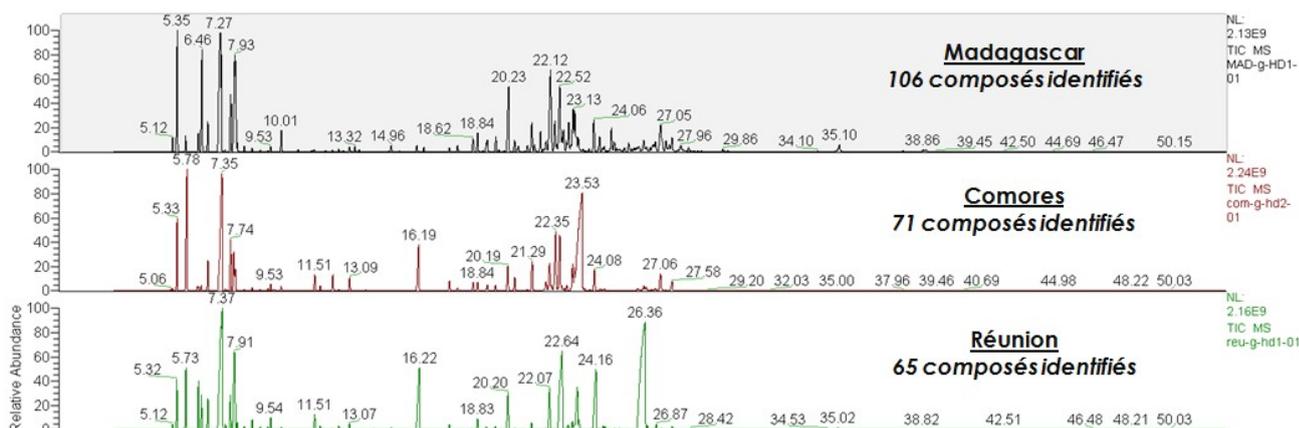
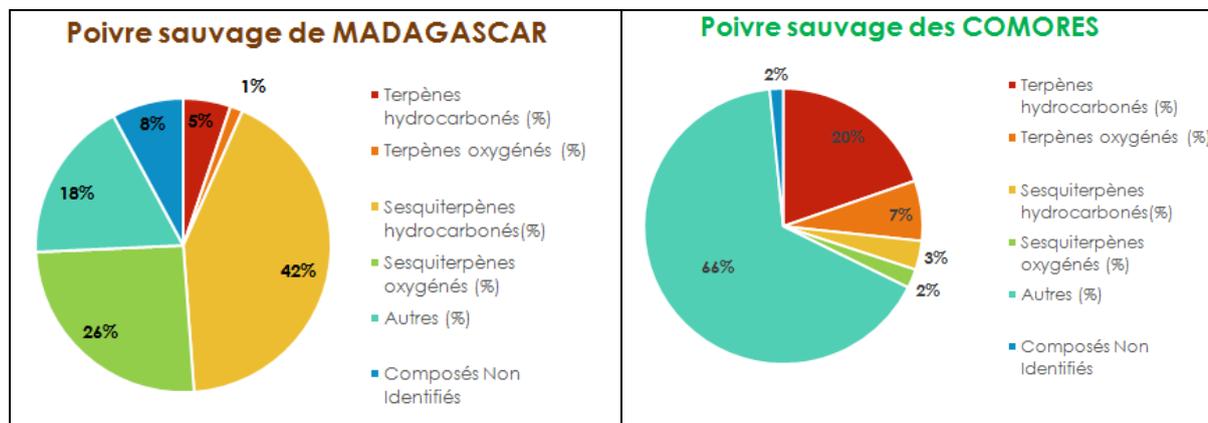


Figure XI : les chromatogrammes en CG-MS des huiles essentielles de graines de poivres sauvages

D.1. Chénotypes des huiles essentielles obtenues à partir des feuilles

A l'instar des huiles essentielles de graines de poivres sauvages, trois chénotypes ont été définis à partir de la composition des huiles essentielles obtenues à partir d'hydrodistillation des feuilles de poivres sauvages de Madagascar, des Comores et de La Réunion (*Piper borbonense*).



	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

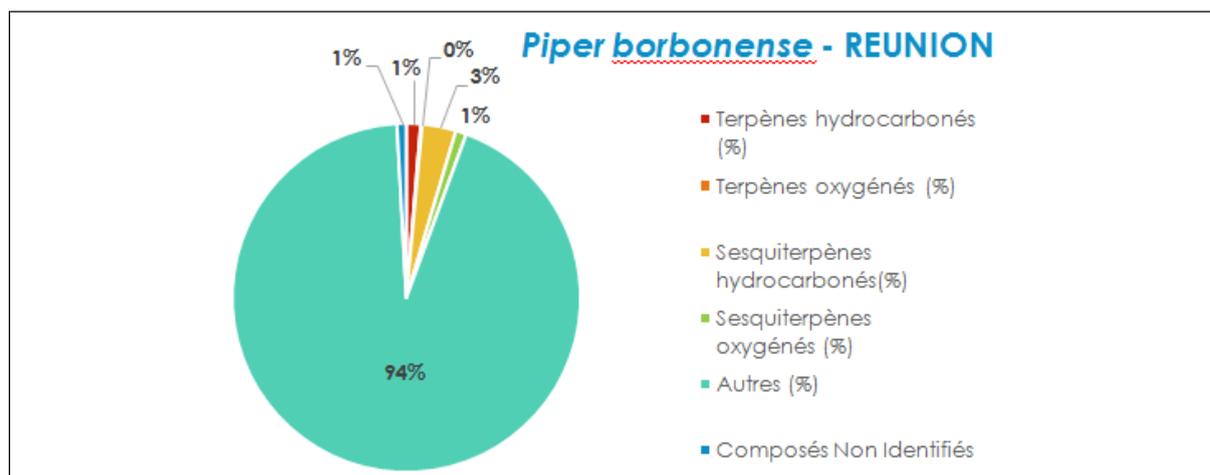


Figure XII : les différents chémotypes des huiles essentielles de feuilles de poivres sauvages

Le chémotype de l'huile essentielle des feuilles du poivre sauvage de Madagascar est caractérisé par une forte concentration de sesquiterpènes hydrocarbonés (42%) et de sesquiterpènes oxygénés (25%) (*réf. Figure XII*).

Pour le chémotype de l'huile essentielle des feuilles du poivre sauvage des Comores, nous observons une concentration majoritaire de composés n'appartenant pas aux familles de terpènes et de sesquiterpènes à 66% et ensuite les terpènes hydrocarbonés à 19% (*réf. Figure XII*).

Le chémotype de l'huile essentielle des feuilles du *Piper borbonense* (La Réunion) se différencie des deux autres huiles essentielles par une forte proportion de composés non terpénoides à 93% (*réf. Figure XII*).

<p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	Date de création : 25/04/2019
			<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>

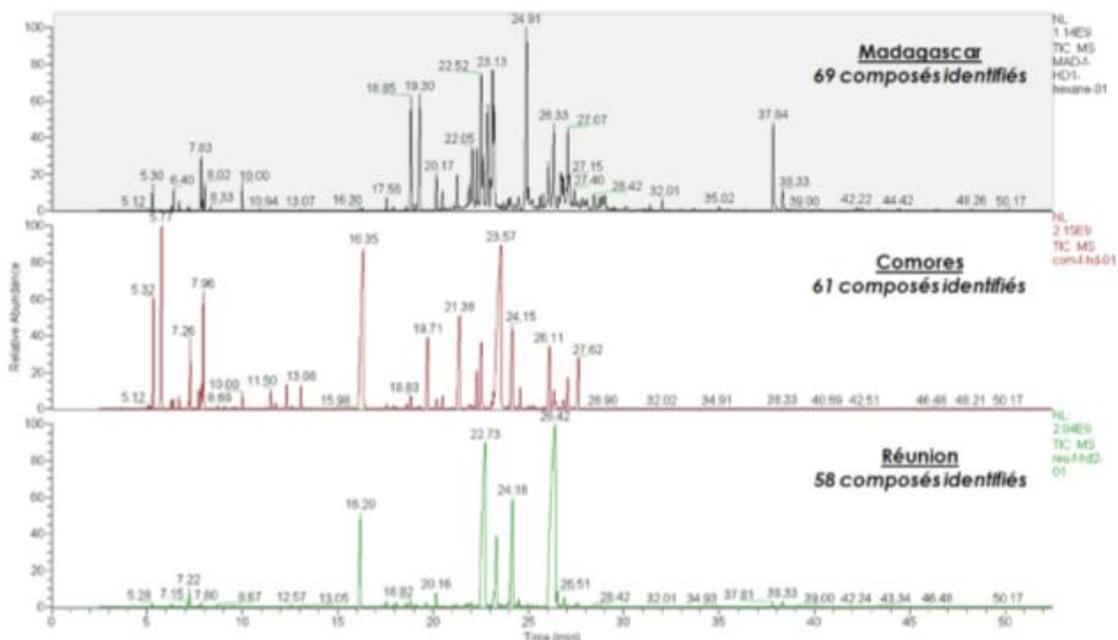


Figure XIII : les chromatogrammes en CG-MS des huiles essentielles des feuilles de poivres sauvages

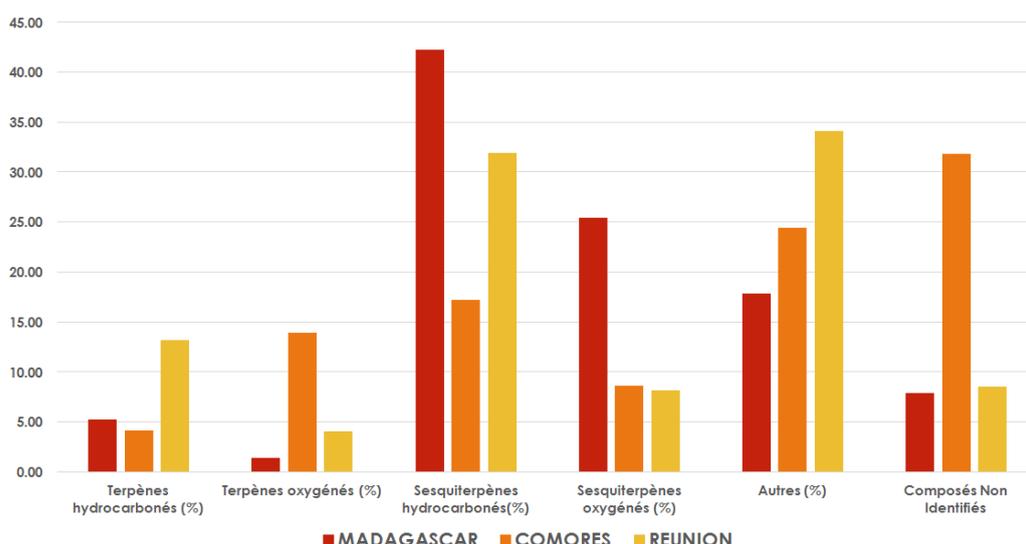


Figure XIV : Répartition de la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de poivres sauvages

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

E.1. Comparaison de deux techniques d'extraction d'huile essentielle : hydrodistillation versus hydrodistillation assistée par les micro-ondes

L'hydrodistillation assistée par les micro-ondes en atmosphère ambiante, permet d'extraire l'huile essentielle avec la vapeur d'eau propre à la matière végétale traitée (sans ajout) ou avec ajout d'eau lorsque celle dernière a une teneur en eau inférieure à 50%.

Le procédé consiste à appliquer à une matière végétale, un rayonnement de micro-ondes dont la puissance est préalablement définie afin que l'eau contenue dans les cellules s'échauffe rapidement et provoque l'éclatement des poches. Il en résulte la libération de l'huile essentielle vers l'extérieur du tissu biologique.

Les avantages majeurs du procédé d'hydrodistillation assistée par micro-onde, sont d'une part, qu'il nécessite très peu de matière première pour obtenir un rendement optimum en huile essentielle et d'autre part, qu'il permet de réduire le temps d'extraction de l'ordre de quelques minutes selon la matière végétale.

Dans le cadre de nos études d'identification des composés aromatiques volatils issus des graines de poivres sauvages par hydrodistillation traditionnelle et assistée par les micro-ondes, nous avons constaté que la composition chimique des huiles essentielles semble ne pas être modifiée par le procédé d'extraction, puisque aucune différence qualitative et quantitative significative n'a été détectée dans la composition des essences par les deux méthodes.

Pour étayer nos observations lors de l'étude de comparaison des compositions chimiques des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation et par hydrodistillation assistée par micro-ondes, nous avons indiqué dans le tableau ci-dessous (*réf. Tableau IX*) les composés aromatiques volatils et leurs concentrations relatives présents dans les deux essences du poivre noir (*Piper nigrum*).

Selon les résultats du tableau IX, nous constatons que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation et celle extraite par micro-ondes, ont tous les deux la même composition chimique, c'est-à-dire 44% de terpènes hydrocarbonés, 33% de sesquiterpènes hydrocarbonés et 17% de terpènes oxygénés.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

ZB-5MS		<i>Piper nigrum</i>		KI exp.	KI théo.
RT (min)	Composé	Aire(%) / HD	Aire (%) / MO		
5.10	alpha-thujene	0.10	0.10	922	931
5.33	alpha-Pinene	4.74	5.07	931	939
5.68	Camphene	0.11	0.13	946	953
6.26	Sabinene	0.36	0.37	969	976
6.43	beta-Pinene	9.05	9.79	976	980
6.68	Myrcene	2.28	2.27	986	991
7.30	Delta-3-Carene	25.88	24.83	1009	1011
7.47	alpha-Terpinene	0.04	0.04	1014	1018
7.54	ortho-Cymene	0.08	0.08	1016	1022
7.71	para-Cymene	1.16	1.10	1022	1026
7.94	1,8-Cineole (2)	15.88	16.47	1030	1033
8.32	trans-beta-Ocimene	0.03	0.03	1042	1050
8.68	gamma-Terpinene	0.11	0.11	1054	1062
9.38	para-Mentha-2,4(8)-diene	0.29	0.28	1078	1086
9.51	Terpinolene	0.64	0.64	1081	1088
9.99	Linalool	0.36	0.43	1097	1098
11.97	Pinocarvone	0.02	0.03	1157	1162
12.56	Terpin-4-ol	0.04	0.04	1176	1177
12.76	Cryptone	0.02	0.02	1182	1184
12.78	para-Cymen-8-ol	0.02	0.02	1183	1183
13.04	alpha-Terpineol	0.05	0.06	1190	1189
13.79	Sabinene hydrate acetate	0.04	0.04	1214	1219
17.43	delta-Elemene (isomere)	0.05	0.04	1326	
17.54	delta-Elemene	1.11	1.05	1330	1339
17.91	alpha-Cubebene	0.12	0.12	1341	1351
18.81	alpha-Copaene	1.52	1.58	1370	1376
19.25	beta-Elemene	0.75	0.77	1383	1391
20.20	beta-Caryophyllene	25.99	26.14	1414	1418
20.65	alpha-Guaiene	0.23	0.23	1429	1439
21.05	Cadina-3,5-diene **	0.02	0.03	1442	
21.25	alpha-Humulene	1.59	1.60	1448	1454
21.77	gamma-Murolene (isomere)	0.04	0.06	1464	1477
22.09	Germacrene D	0.13	0.18	1474	1480
22.29	beta-Selinene	1.34	1.37	1482	1485
22.50	alpha-Zingiberene (1495)+ Asaricin (1500)	1.05	1.06	1490	1495
22.82	(E,E)-alpha-Farnesene	0.35	0.37	1500	1509
23.00	gamma-Cadinene	0.05	0.06	1506	1513
23.10	Cubebol	0.61	0.58	1509	1514
23.34	beta-Sesquiphellandrene	0.28	0.27	1517	1524
23.55	Cadina-1,4-diene [syn. Cubenene]	0.02	0.02	1525	1532
23.81	cis-Sesquiphellandrene hydrate	0.02	0.05	1535	1545
24.04	Elemol (1549) + Elemicin (1551)	0.05	0.08	1542	1551
24.29	Germacrene B	0.05	0.05	1551	1556
24.43	trans-Nerolidol	0.04	0.04	1555	1564
24.83	Germacrene D-4-ol	0.08	0.07	1569	1574
24.95	Caryophyllene oxide	0.77	0.70	1573	1581
25.73	Humulene epoxide	0.06	0.05	1600	1606
26.00	Dill Apiole	0.08	0.06	1610	1622

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

26.06	10-epi-gamma-Eudesmol	0.04	-	1612	1619
26.27	1-epi-Cubenol	0.89	0.56	1620	1627
26.45	alpha-Acorenol	0.05	0.03	1626	1630
27.10	Selin-11-en-4-alpha-ol	0.09	0.04	1651	1652
27.27	ar-Turmerone	0.03	0.02	1656	1664
27.42	14-hydroxy-9-epi-trans-Caryophyllene **	0.04	0.02	1661	1664
27.93	alpha-Bisabolol	0.04	-	1680	1683
38.97	acide Oleique	0.07	-	2131	2141
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		98.95	99.25		
Terpènes hydrocarbonés (%)		44.87	44.84		
Terpènes oxygénés (%)		16.41	17.09		
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)		33.64	33.94		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		2.76	2.16		
Autres (%)		1.27	1.22		
TOTAL		98.95	99.25		

Tableau IX: Liste des composés volatils identifiés dans les deux huiles essentielles de graines du *Piper nigrum* extraites par hydrodistillation et par micro-ondes.

3.1.2.2 Etude de la composition chimique de l'espace de tête (Headspace statique) des graines et des feuilles des poivres sauvages.

F) Partie expérimentale

Les analyses ont été effectuées sur une colonne capillaire ZB-5MS de dimensions suivantes : 30 m X 0.25mm (DI), et 0.25µm d'épaisseur de phase de la marque Phenomenex®.

Injection:

Volume injecté : 1 mL espace gazeux

Conditions chromatographiques utilisées :

Injecteur: Température: 250°C

Débit constant : 2.0 ml/min Hélium N60

Split flow: 80 ml/min

Programmation de la Chromatographie Gazeuse :

Temp (°C)	Gradient (°C/min)	Pause (min)	Total (min)
50	4.0	0.00	0.00
250	30.0	0.00	0.00
.....280.....	0.0.....	2.00.....	53.00

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

Durée de l'injection : 53 minutes

Réglage du Filament en impact électronique: -70.0 V

Temperatures:

Temp. Ligne Transfer: 250°C

Temp. Source d'ions: 250°C

Ségment Full Scan Volatils

Durée: 2.50 à 53.00 minutes

Type Scan: Full

Fenêtre Masse: 40:450 Da

Type d'ionisation: EI

Paramètres Générales:

Mode du Scan: Normal

Temps du Scan: 0.2 seconds/scan (Dwell time)

Détecteur à ionisation de flamme (FID):

Temp.: 280°C

Air : 250 ml/min

Hydrogène : 35 ml/min

Makeup gaz : 30 ml/min

La détection des métabolites secondaires présents dans les espaces de tête statiques (HS) des graines et des feuilles du poivre de Madagascar, de La Réunion et des Comores ont été effectuée par couplage de la chromatographie gazeuse (Trace 1300 de Thermo Scientific) et la spectrométrie de masse (TSQ 8000 Evo de Thermo Scientific) par l'impact Electronique (EI) positive.

Les constituants de l'espace de tête statiques (HS) ont été identifiés en se référant à leur indice de Kovats et en comparant leurs spectres de masse à ceux des composés de référence grâce à un logiciel d'aide à l'identification muni de libraires telles que NIST14, Wiley11 et FFNSC3. Les indices de Kovats de chaque composé ont été calculés par rapport aux temps de rétention de la série des alcanes linéaire C8 à C23. De plus, pour lever toutes les ambiguïtés d'identification des composés volatils (*réf. Liste I*), les spectres de masse ont été comparés aux données spectrométriques tirées de la littérature (*réf. Adams, 1995*).

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

G) Résultats et discussions

L'échantillonnage par l'espace de tête statique (HS) est un excellent procédé pour l'étude qualitative et quantitative des composés volatils présents dans des échantillons. La technique consiste à prélever un volume gazeux pré-défini et enrichi en molécules volatiles qui se sont réparties à l'équilibre, entre la matrice liquide ou solide et l'espace gazeux du récipient étanche. C'est particulièrement une très bonne technique pour l'analyse des échantillons dont on ne peut pas injecter directement dans la chromatographie gazeuse, en l'occurrence des espèces trop chargées ou « sales ». La technique HS est spécialement adaptée à l'analyse des molécules volatiles à l'état de trace.

G.1.1. Composition chimique des espaces de tête des graines de poivres sauvages de Madagascar, des Comores, du *Piper borbonense* (La Réunion) et du *Piper nigrum* (poivre noir).

L'étude de la composition chimique de l'espace de tête statique des graines de poivres sauvages de Madagascar, des Comores, de La Réunion (*Piper borbonense*) et des graines du poivre noir (*piper nigrum* – Marché local de La Réunion), nous a permis d'identifier 4 chémotypes (réf. Tableau X). Le chémotype du poivre sauvage de Madagascar est défini par la présence de l'**alpha-Pinène** à **47.25%**, du **béta-Pinène** à 15.41%, de l'**alpha-Phellandène** à 13.86%, du **delta-3-Carène** à 5.68% et enfin du **Limonène** à 4.51%.

Le chémotype du poivre poivre sauvage des Comores présente du **Camphène** à **49.02%**, du **delta-3-Carène** à 20.76%, de l'**alpha-Pinène** à 19.31%, du **Myrcène** à 2.37%.

En ce qui concerne le chémotype du *Piper borbonense* (La Réunion), celui-ci est constitué du **delta-3-Carène** à **35.93%**, de l'**alpha-Phéllandène** à 15.31%, du **Camphène** à 11.36%, de l'**alpha-Pinène** à 11.10% et du **Limonène** à 7.57%.

Et enfin, le chémotype du *Piper nigrum*, le poivre noir acheté localement à La Réunion, est défini majoritairement par le **delta-3-Carène** à **32.37%**, le **béta-Pinène** à 20.75%, l'**alpha-Pinène** à 17.56%, le **Limonène** à 17.27% et le **Myrcène** à 3.80%.

Cette approche nous a aussi permis d'une part, de constater que le chémotype du *Piper borbonense* se rapproche le plus du chémotype du *Piper nigrum* (le poivre noir) (réf. Tableau X) et d'autre part, de remarquer que les tous les poivres sauvages y compris le poivre noir (*Piper nigrum*) se caractérisent par une prédominance de la famille des monoterpènes hydrocarbonés (réf. Figure XVI).

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

ZB-5MS		HEADSPACE Graines poivres				KI exp.	KI théo.
		MADAGASCAR	COMORES	REUNION	REF.		
		Poivre sauvage	Poivre sauvage	Piper Borbonense	Piper nigrum		
RT (min)	Composé	Aire (%)	Aire(%)	Aire (%)	Aire(%) / HD		
5.05	Tricyclene	0.02	0.43	0.13	0.38	920	926
5.12	α-Thujene	2.52	0.33	1.12	-	923	931
5.34	α-Pinene	47.25	19.31	11.10	17.56	931	939
5.54	N.I	0.01	-	-	-	940	-
5.65	α-Fenchene	-	-	-	0.04	944	951
5.7	Camphene	1.76	49.02	11.36	-	946	953
5.79	Thuja-2,4(10)-diene	0.05	-	-	0.28	950	957
6.22	Verbenene	-	0.27	-	-	968	967
6.26	Sabinene	1.39	0.27	5.43	0.82	969	976
6.42	β-Pinene	15.41	0.41	3.57	20.75	974	980
6.68	Myrcene	1.80	2.37	3.28	3.80	986	991
6.96	δ-2-Carene	0.00	0.02	0.02	0.02	997	1001
7.1	Pseudolimonene	-	-	-	0.02	1002	1004
7.19	α-Phellandrene	13.86	1.99	15.31	3.65	1005	1005
7.25	δ-3-Carene	5.68	20.76	35.93	32.37	1008	1011
7.46	α-Terpinene	0.04	0.04	0.20	0.04	1014	1018
7.54	ortho-Cymene	0.01	0.03	0.02	0.07	1017	1022
7.69	para-Cymene	1.63	1.65	1.36	0.99	1021	1026
7.83	Limonene	4.51	1.50	7.57	17.27	1026	1031
7.88	β-Phellandrene	3.21	0.51	1.45	-	1027	1031
7.91	Eucalyptol	-	0.35	-	-	1029	1033
8.01	(Z)-β-Ocimene	0.11	-	0.26	0.02	1032	1040
8.32	(E)-β-Ocimene	0.06	0.02	0.12	0.03	1043	1050
8.49	N.I	-	-	0.01	-	1048	-
8.68	γ-Terpinene	0.03	0.05	0.32	0.07	1054	1062
9.05	cis-Sabinene hydrate	0.01	-	0.06	-	1066	1068
9.39	Isoterpinolene	0.01	0.03	0.08	0.13	1078	1086
9.51	Terpinolene	0.03	0.10	0.36	0.29	1081	1088
9.59	Fenchone	-	-	0.01	-	1084	1087
9.97	Linalool	0.08	0.03	0.06	0.09	1097	1098
11.48	Camphre	0.01	0.08	0.20	-	1143	1143
11.73	Camphene hydrate	-	0.02	0.03	-	1151	1148
12.28	Borneol	-	0.05	0.02	-	1168	1165
12.54	Terpin-4-ol	-	-	0.02	-	1176	1177
13.06	α-Terpineol	0.01	0.03	0.03	-	1191	1189
13.3	α-Phellandrene epoxide	0.01	-	-	-	1199	**
14.94	Piperitone	0.01	-	0.01	-	1249	1252
16.08	Safrole	-	0.12	0.40	-	1284	1285
17.54	δ-Elemene	0.01	0.02	0.01	0.09	1330	1339
17.91	α-Cubebene	0.02	-	-	-	1341	1351
18.59	Cyclosativene	0.03	0.02	-	-	1363	1368
18.8	α-Copaene	0.04	0.02	0.02	0.10	1369	1376
19.24	β-Elemene	0.03	-	-	0.03	1383	1391
20.14	β-Cedrene	0.16	0.04	0.07	1.05	1412	1418
20.45	β-Gurjunene	0.01	-	-	-	1422	1432
21.22	α-Humulene	0.02	0.02	-	0.04	1448	1454
21.61	β-Acoradiene	0.02	-	-	-	1460	1466

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

22.00	Germacrene D	0.10	0.02	0.02	-	1473	1480
22.23	β-Selinene	0.01	0.05	-	-	1481	1485
22.45	α-Selinene	0.03	0.02	0.03	-	1488	1494
25.99	Dill Apiole **	-	-	0.01	-	1610	1622
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		99.99	100.00	99.99	100.00		

Terpènes hydrocarbonés (%)	99.38	99.46	98.99	98.60
Terpènes oxygénés (%)	0.13	0.33	0.84	0.09
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)	0.48	0.213	0.15	1.31
Sesquiterpènes oxygénés (%)	0.00	0.00	0.00	0.00
Autres (%)	0.00	0.00	0.01	0.00
TOTAL	99.99	100.00	99.99	100.00

Tableau X: Liste des composés volatils identifiés dans l'espace de tête des graines des poivres sauvages de Madagascar, des Comores, du *Piper borbonense* (La Réunion) et du *Piper nigrum* (le poivre noir).

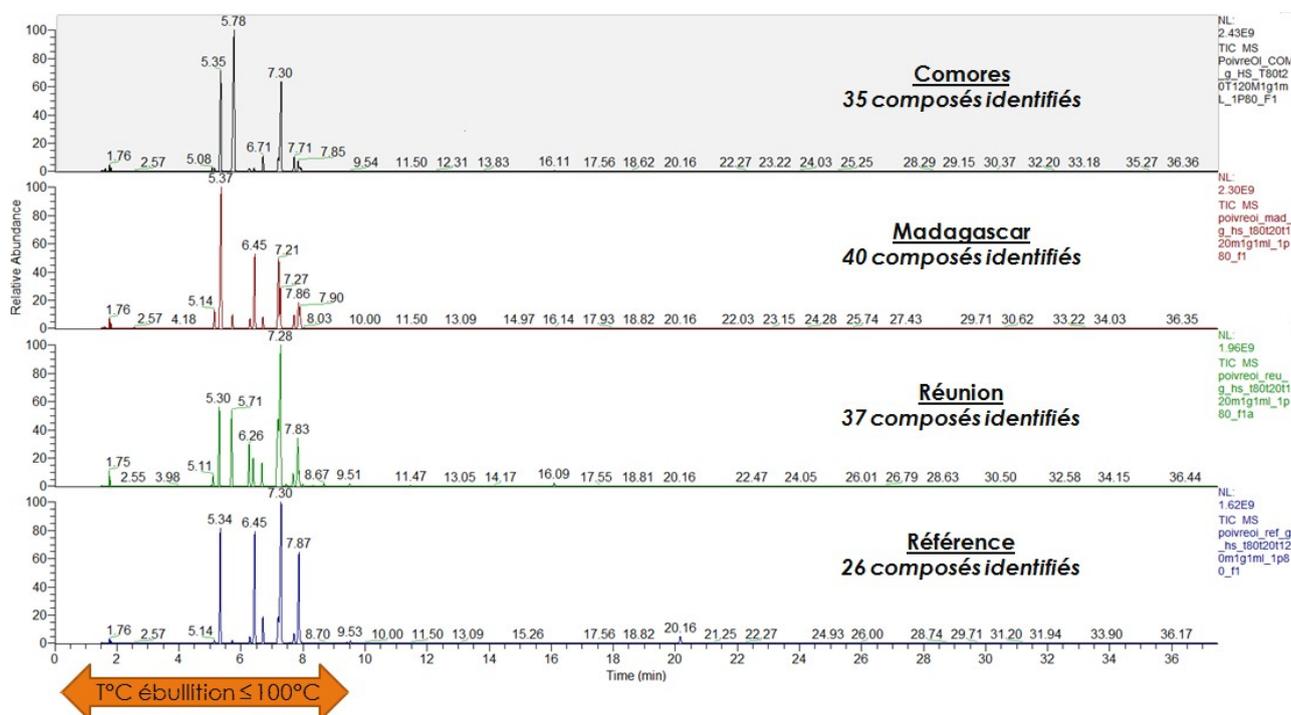


Figure XV : Chromatogrammes de l'espace de tête des graine de poivres sauvages et noirs

<p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
	<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>

Les différents chénotypes des graines de poivre par HS

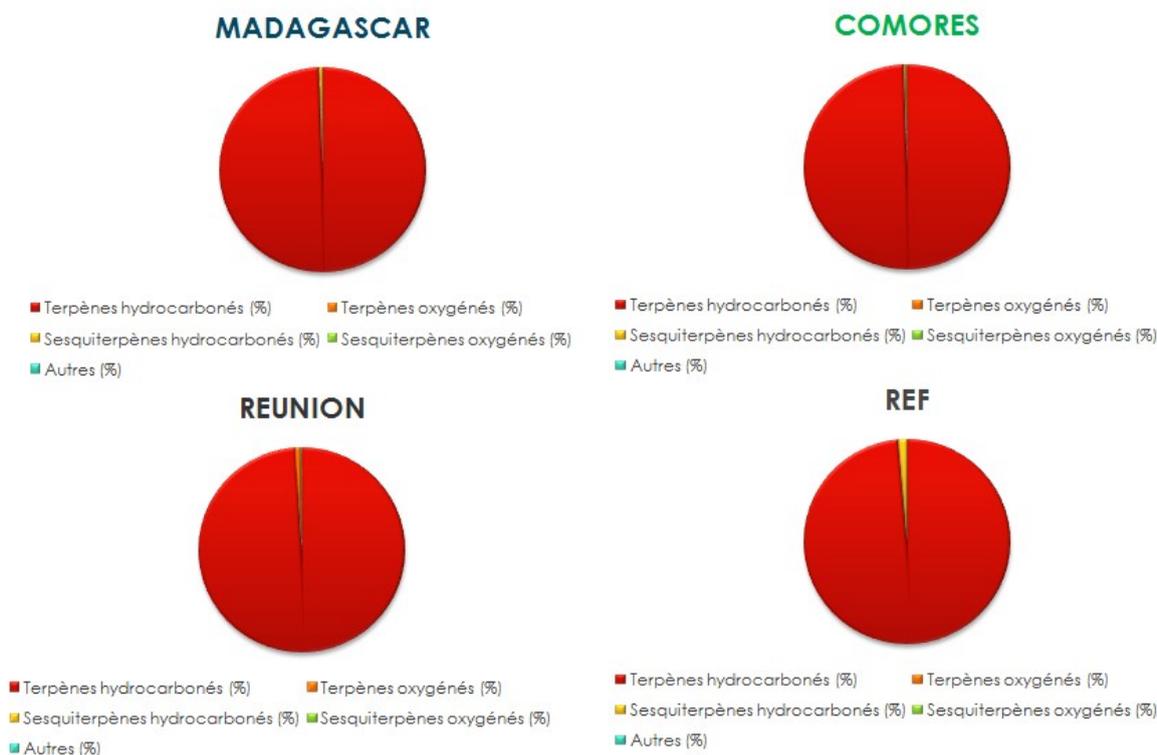


Figure XVI : les chénotypes de l'espace de tête des graines de poivres sauvages et noirs par famille de composés volatils.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

G.1.2. Composition chimique des espaces de tête des feuilles de poivres sauvages de Madagascar.

L'étude de la composition chimique de l'espace de tête statique des feuilles de poivres sauvages de Madagascar, des Comores, de La Réunion (*Piper borbonense*), nous a permis de caractériser 3 chémotypes ci-dessous (réf. Tableau XI).

Le chémotype des feuilles du poivre sauvage de Madagascar montre une composition chimique riche en **Limonène à 18.79%**, en **Linalool** à 15.67%, en **Eucalyptol** à 15.12%, en **alpha-Pinène** à 12.13% et en **béta-Pinène** à 8.61%.

Le chémotype des feuilles du poivre sauvage des Comores présente du **Camphène à 57.22%**, de l'**alpha-Pinène** à 25.17%, de l'**Eucalyptol** à 5.44%, du **delta-3-Carène** à 5.08% et du **Limonène** à 1.44%.

Enfin, le chémotype des feuilles du *Piper borbonense* (La Réunion), celui-ci est constitué à **42.24% du delta-3-Carène**, à 8.96% de **Safrole**, à 8.91% de **Sabinène**, à 5.95% d'**alpha-Pinène** et à 5.46% d'**alpha-Phéllandène**.

Cette approche nous a aussi permis d'une part, de remarquer que le chémotype des feuilles des trois poivres sauvages, se caractérisent par une prédominance de la famille des monoterpènes hydrocarbonés (réf. Figure XVIII), et d'autre part, de constater que le chémotype du *Piper borbonense* possède un chémotype qui se démarque des deux autres par la présence du Safrole, comme second composé majoritaire (réf. Tableau XI).

ZB-5MS		HEADSPACE Feuilles Poivres			KI exp. KI théo.	
		MADAGASCAR	COMORES	REUNION		
		Poivre sauvage	Poivre sauvage	<i>Piper borbonense</i>		
RT (min)	Composé	Aire (%)	Aire(%)	Aire (%)		
5.05	Tricyclene	-	0.42	-	920	926
5.12	α -Thujene	0.71	0.64	3.56	923	931
5.34	α -Pinene	12.13	25.17	5.95	931	939
5.7	Camphene	0.45	57.22	1.24	946	953
6.26	Sabinene	1.41	0.39	8.91	969	976
6.42	β -Pinene	8.61	0.73	3.25	974	980
6.55	Methyl-2-heptene-6-one	0.83	-	0.33	981	985
6.68	Myrcene	4.16	0.83	2.26	986	991
7.1	Pseudolimonene	-	-	0.15	1002	1004
7.19	α -Phellandrene	-	0.19	5.46	1005	1005
7.25	δ -3-Carene	-	5.08	42.24	1008	1011
7.46	α -Terpinene	-	0.05	1.25	1014	1018

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

7.54	ortho-Cymene	-	0.01	2.09	1017	1022
7.69	para-Cymene	-	0.67	-	1021	1026
7.83	Limonene	18.79	1.44	3.49	1026	1031
7.88	β-Phellandrene	-	-	1.07	1027	1031
7.91	Eucalyptol	15.12	5.44	-	1029	1033
8.01	(Z)-β-Ocimene	4.70	-	1.16	1032	1040
8.32	(E)-β-Ocimene	0.64	-	0.27	1043	1050
8.68	γ-Terpinene	-	0.06	1.80	1054	1062
9.05	cis-Sabinene hydrate	-	0.02	0.35	1066	1068
9.39	Isoterpinolene	-	0.03	0.88	1078	1086
9.59	Fenchone	-	0.02	-	1084	1087
9.97	Linalool	15.67	0.13	0.50	1097	1098
11.48	Camphre	-	0.12	-	1143	1143
11.73	Camphene hydrate	-	0.02	-	1151	1148
12.28	Borneol	-	0.06	-	1168	1165
13.06	α-Terpineol	-	0.05	-	1191	1189
16.08	Safrole	0.61	1.04	8.96	1284	1285
17.38	Isomère δ-Elemene**	-	-	0.27	1325	-
17.54	δ-Elemene	-	-	0.26	1330	1339
17.91	α-Cubebene	0.61	-	0.25	1341	1351
18.59	Cyclosativene	-	0.01	0.39	1363	1368
18.8	α-Copaene	8.24	0.03	0.49	1369	1376
19.03	β-Bourbonene	-	-	0.19	1377	1384
19.24	β-Elemene	3.59	-	-	1383	1391
	Methyl Eugenol	-	0.02	-	1395	1401
20.14	β-Cedrene	1.39	-	0.46	1412	1418
20.45	β-Gurjunene	0.45	0.01	-	1422	1432
21.22	α-Humulene	0.43	0.04	-	1448	1454
22.23	β-Selinene	0.72	0.02	-	1481	1485
22.45	α-Selinene	0.39	0.02	1.60	1488	1494
22.54	α-Murolene	0.35	-	-	1491	1499
24.00	Elemicin**	-	-	0.18	1541	1554
25.99	Dill Apiole **	-	-	0.74	1610	1622
TOTAL COMPOSES IDENTIFIES (%)		100.00	99.98	100.00		
Terpènes hydrocarbonés (%)		51.60	92.93	85.03		
Terpènes oxygénés (%)		31.40	6.9	9.81		
Sesquiterpènes hydrocarbonés (%)		16.17	0.130	3.91		
Sesquiterpènes oxygénés (%)		0.00	0.00	0.00		
Autres (%)		0.83	0.02	1.25		
TOTAL		100.00	99.98	100.00		

Tableau XI: Liste des composés volatils identifiés dans l'espace de tête des feuilles des poivres sauvages de Madagascar, des Comores et du *Piper borbonense* (La Réunion)

<p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
	<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>

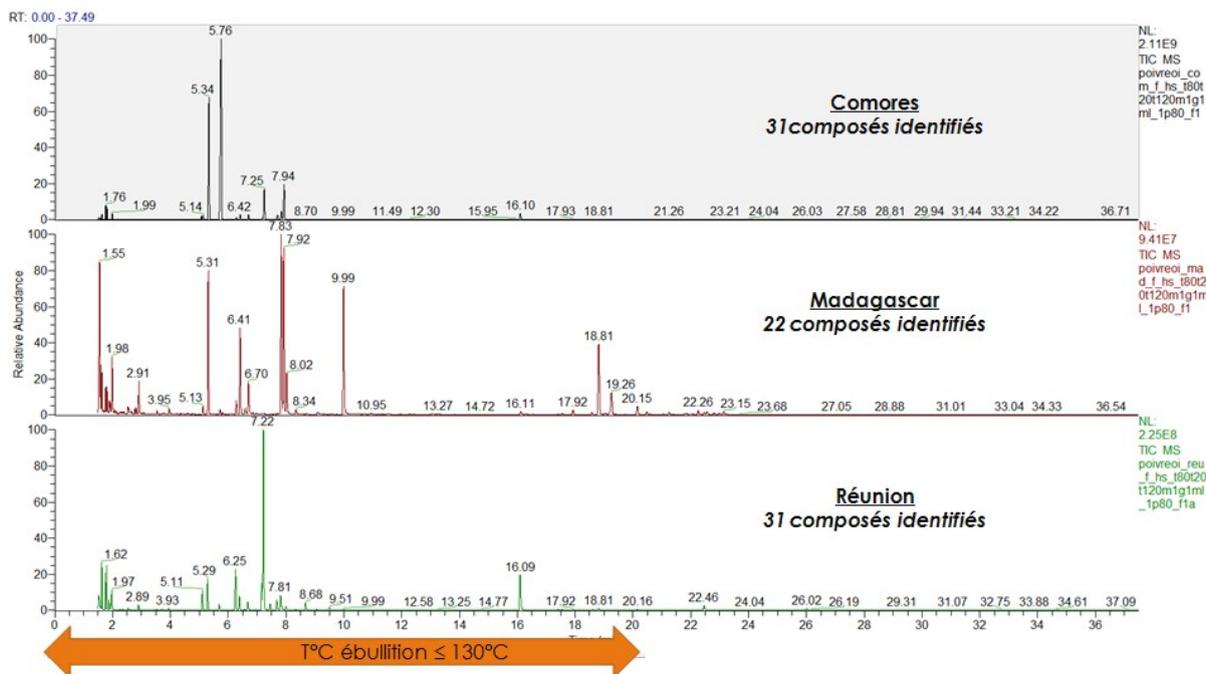


Figure XVII : Chromatogrammes de l'espace de tête des graine de poivres sauvages et noirs

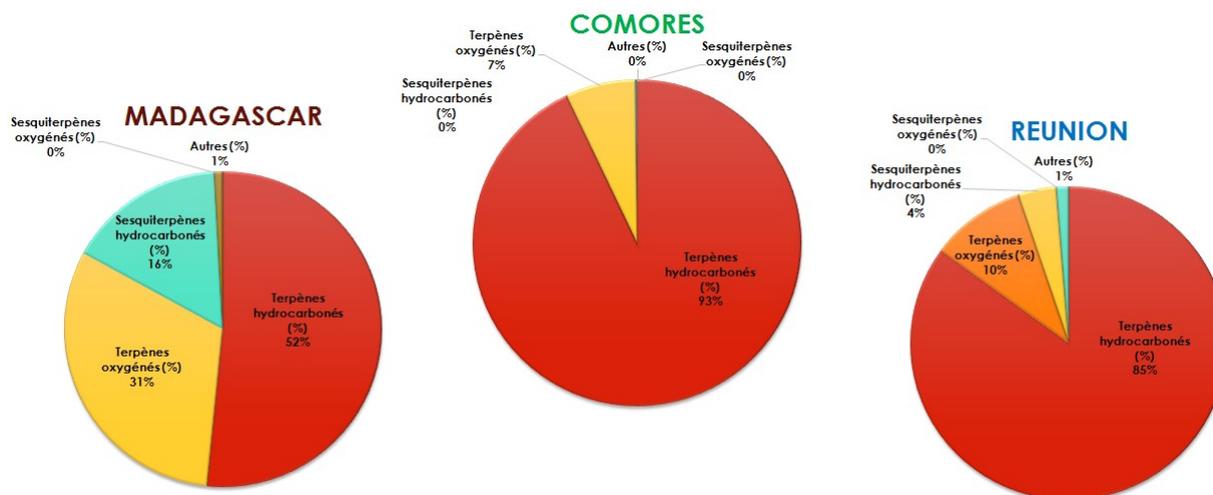


Figure XVIII : les chémotypes de l'espace de tête des feuilles de poivres sauvages par famille de composés volatils.

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

3.2 TESTS D'EFFICACITE

Etude des propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire et antioxydante pour comparaison des HE des différents poivres sauvages vs HE témoin

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

3.2.1 Introduction

A la demande du porteur de projet, il a été demandé d'étudier :

- Au maximum :
 - 3 lots de poivres * 1 compartiment * 2 techniques (HD/MW) = 6 HE
 - + 1 témoin

Soit 7 échantillons pour les tests biologiques

Ou bien

- Au minimum :
 - 3 lots de poivres * 1 compartiment * 1 seule technique = 3 HE
 - + 1 témoin

Soit 4 échantillons pour les tests biologiques

Concernant les tests antimicrobien, antioxydant et anti-inflammatoire, nous avons retenu l'étude des propriétés biologiques sur 3 lots de poivres et 1 témoin, soit 4 échantillons pour les tests :

- 1 lot de poivre de Madagascar * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé MAD-g-HD1**
- 1 lot de poivre des Comores * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé COM-g-HD2**
- 1 lot de poivre de la Réunion * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé REU-g-HD1**
- 1 lot de poivre du commerce Aromazone * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé REF1 AZ**

Chaque HE est testée à 5 concentrations différentes et en n=3 répétitions techniques afin de déterminer les potentiels effets :

- Anti-inflammatoire, test Quanti-Blue sur lignée cellulaire tumorale humaine, les A549-Dual, réf a549d-nfis de chez InvivoGen
- Antimicrobien, test de type antibiogramme, détermination de la CMI et de la CMB sur 4 souches pathogènes pour l'Homme :
 - *Candida albicans* ATCC® 10231 (levure)

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

- *Escherichia coli* ATCC® 8739 (bactérie GRAM -)
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538 (bactérie GRAM +)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027 (bactérie GRAM -)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

- Antioxydant, test DPPH : radical stable DPPH* utilisé pour déterminer la capacité que possèdent les antioxydants à piéger les radicaux libres

ABREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection
CO₂	Dioxyde de carbone
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
HD	Hydro Distillation
PBS	Phosphate Buffered Saline
Sem	Ecart Standard de la Moyenne
SN	Surnageant
SVF	Sérum de veau fœtal
TNF	Tumor Necrosis Factor

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

3.2.2 MATERIELS ET METHODES

• Modèles biologiques tests *in-vitro* cellulaires

Pour le test anti-inflammatoire :

- ✓ Type cellulaire : A549-Dual, réf a549d-nfis InvivoGen: cellule épithéliale humaine de poumon avec intégration d'un gène rapporteur SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase)
- ✓ Conditions de culture : 37°C, 5% CO₂
- ✓ Milieu de culture : DMEM complété avec

Composants :	Concentrations :
L-glutamine	2mM
Pénicilline	50 U/ml
Streptomycine	50 µg/mL
Sérum de veau fœtal	10% final
Sodium pyruvate	20 mM
Amphotéricine B	250 µg

Pour le test anti-bactérien :

- ✓ Types microbiens :
 - *Escherichia coli* (*E.coli*), référence ATCC 8789
 - *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), référence ATCC 6538
 - *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), référence ATCC 9027
 - *Candida albicans* (*C. albicans*), référence ATCC 10231
- ✓ Conditions de culture : 32.5 ± 2.5°C
- ✓ Milieu de culture : Gélose Muller Hinton

Composants :	Concentrations :
Peptones	3,0 g/litre
Hydrolysate de caséine	17,5 g/litre
Agar	15,0 g/litre
Ca ²⁺	20,0 - 25 mg/L
Mg ²⁺	10 - 12,5 mg/L
pH final : 7,4 ± 0,2	

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

- **Test *in-vitro* acellulaire**

Pour le test DPPH :

- ✓ Réactif : DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl ; CAS n°1707-75-1 ; Mw= 395.33g/mol) solubilisé à 0.15mM dans le méthanol
- ✓ Gamme échantillon HE / gamme antioxydant de référence Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid ; CAS n°53188-07-1 ; Mw= 250.29g/mol)/ témoin blanc
- ✓ Lecture de l'absorbance à 517nm après incubation

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

• Composés testés

Les HE sont reçues en flacon de verre ambré et à +4°C.

- D'après les résultats des tests de cytotoxicité au rouge neutre et au LDH, la concentration la plus forte en HE et non cytotoxique retenue pour le test anti-inflammatoire est de 0.016% pour chaque HE (Voir chapitre 3.3 Tests de cytotoxicité). D'autre part, les HE sont solubilisés en DMSO à une dose non cytotoxique. Test du solubilisant réalisé en interne par Bio'R lors de sa mise au point sur HE.
- Concernant le test antimicrobien, en raison de la limite de solubilité de l'HE en milieu aqueux, la concentration la plus forte testée est de 10% en HE avec 1% en DMSO pour cette concentration. D'autre part, les HE sont solubilisés en DMSO à une dose non cytotoxique. Test du solubilisant réalisé en interne par Bio'R lors de sa mise au point sur HE.
- Pour le test DPPH qui se réalise en milieu méthanolique, après des essais préliminaires à des doses faibles qui n'ont donné aucun résultat, la concentration la plus forte testée est de 10% en HE (pour les HE témoins poivre noir, dont les quantités sont moins limitées) et de 5% pour les HE de poivres sauvages avec une adaptation du protocole initial (mélange en Eppendorf puis transfert sur plaque).

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

Tableau 3.2.A : Récapitulatif des composés à tester :

HE testées	Solutions stocks	Test anti-inflammatoire	Test anti-bactérien	Test anti-oxydant
		Concentrations testées		
MAD-g-HD1	HE complète (hydrodistillation 6h)	0.016%*	10%*	5%**
COM-g-HD2	HE complète (hydrodistillation 6h)		5	2.5%
REU-g-HD1	HE complète (hydrodistillation 6h)		2.5	1.25%
REF1 AZ	HE 100% pure <i>Piper nigrum</i> Origine : Madagascar Partie : Fruit Lot : 18HE0112/1-02729		1.25	0.62%
			0.63	0.31%
		0.31	0.15%	
		0.16		
		0.08		
		0.04		

HE testées	Solutions stocks	Test anti-inflammatoire	Test anti-bactérien	Test anti-oxydant
		Concentrations testées		
HE Cannelle de Ceylan	HE 100% pure <i>Cinnamomum Zeylanicum</i> Origine : Madagascar Lot : CANFEC 2015-16/001	/	10%*	/
			5	
			2.5	
			1.25	
			0.63	
			0.31	
			0.16	
			0.08	
		0.04		

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

*correspond au volume d'HE final dans le milieu de culture en considérant l'HE reçue à 100%. Les conditions techniques, ex. solubilisation en HE, milieu aqueux, DMSO, nous impose de travailler à une concentration maximale de 10% en HE. Au-delà, nous rencontrons des problèmes divers (grands volumes en HE à prélever avec un stock limité, solubilité difficile en restant avec des doses non cytotoxique du solubilisant etc.)

**correspond au volume d'HE final dans le puits de la plaque. 10% correspond au volume maximal que l'on peut tester par rapport au protocole utilisé (25µL) et a été testé uniquement pour les HE de poivre noir.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

• **Choix des contrôles**

Pour le test anti-inflammatoire, stimulation pro-inflammatoire :

Le TNF (Tumor Necrosis Factor) est une cytokine qui induit l'inflammation chez des cellules dont les A549-dual. Cette inflammation se traduit par l'activation de la voie NF-κB produisant l'expression de l'enzyme SEAP (alkaline phosphatase) dans le surnageant de culture. Le Quantiblu est un substrat de cette enzyme qui se réduit en produit de coloration bleu. Cette coloration est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 620 nm.

Tableau 3.2.B : Récapitulatif du type cellulaire testé et de son contrôle de stimulation :

Cellule testée	Contrôle positif Facteur de stimulation	Concentration testée	Durée du traitement
A549-Dual	TNF Peprotech	10ng/ml en milieu d'essai	24 heures

Pour le test anti-bactérien :

La Cannelle de ceylan est connue pour ses propriétés antimicrobiennes et notamment sur les germes pathogènes pour l'Homme. Un exemple dans cet article :

Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries, Nutrients. 2015 Sep; 7(9): 7729–7748.

Tableau 3.2.C : Récapitulatif des types microbiens testés et du contrôle antimicrobien:

Souches testées	Contrôle positif	Concentrations testées	Durée du traitement
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8789 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Cannelle de Ceylan	10 à 0.04% HE dilutions en log2 En milieu d'essai	18-24 h CMI Puis 48 h CMB

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

Pour le test DPPH :

Le Trolox est un antioxydant de référence utilisé pour ce type de test (droite étalon).

• **Protocoles**

Pour le test anti-inflammatoire, Quanti-Blue™ :

✓ Culture et traitement

- Type cellulaire : A549-Dual en milieu d'essai
- Temps d'incubation : 24 heures
- Paramètres d'évaluation : stimulation des cellules au TNF avec présence d'HE à une concentration non cytotoxique. Observations morphologiques des cellules au microscope inversé 24h après stimulation puis dosage de la SEAP par Quanti-Blue™.

Les A549-Dual sont déposées en plaque 96 puits et sont cultivées en milieu de culture pendant 24 heures en présence ou non d'HE. Les cellules sont ensuite mises en contact ou non avec les HE et stimulées ou non avec le TNF puis incubées 24 heures.

Les conditions ont été réalisées en n=3.

A la fin du traitement, chaque surnageant de cellule est incubé en présence de Quanti-Blue™ pendant 2h à 37°C, 5% CO₂. La densité optique (DO) est représentative de l'inflammation et elle est mesurée avec un lecteur de microplaque TECAN à 620nm. Plus il y a d'inflammation, plus la DO augmente.

Tableau 3.2.D : Synthèse des conditions expérimentales

Type cellulaire	Dosage	Contrôle de stimulation
A549-Dual	SEAP par Quanti-Blue™	TNF 10ng/ml

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A		Date de mise à jour : 31/01/2020

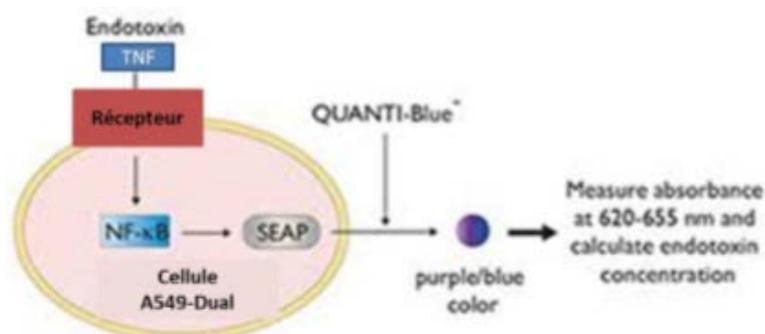


Figure 3.2.A : schéma de synthèse de l'induction de l'inflammation par TNF sur les A549-Dual
 Pour le test anti-bactérien, CMI et CMB :

✓ Culture et traitement

- Types microbiens : *Escherichia coli* ATCC 8789
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Candida albicans ATCC 10231
- Temps d'incubation : 18-24 heures CMI
- Temps d'incubation : si CMI positive, remise en culture 48h pour la CMB
- Paramètres d'évaluation :

La **CMI** ou **Concentration Minimale Inhibitrice**. Il s'agit de la concentration de l'HE la plus faible pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée (pas de croissance de la souche ; 100% de survivants). Les souches sont déposées en plaque 96 puits et sont mises en contact ou non avec les HE. Les souches sont ensuite incubées 18-24h sous agitation à 32.5°C ± 2.5°C. A la fin de l'incubation, le résultat se fait par lecture visuelle d'un trouble ou non du milieu de culture. Un trouble signifie que le micro-organisme résiste à l'HE est se développe alors qu'un non trouble signifie que le micro-organisme est soit inhibé (CMI) soit détruit (CMB) par l'HE. Pour le savoir, la suite du test est la CMB.

La **CMB** ou **Concentration Minimale Bactéricide**. C'est la concentration de l'HE la plus faible permettant de détruire 99.99% des micro-organismes présents au départ (soit un micro-organisme survivant sur 10000). Si la CMB < 5 CMI l'antibiotique est très efficace. Au contraire si la CMB > 10 CMI, on le considère peu efficace. Après lecture des CMI, chaque puit avec le milieu de culture ne contenant pas de trouble visible est prélevé et déposé dans une nouvelle plaque 96 puit contenant du milieu neuf. Les milieux sont incubés ensuite 48h sous agitation à 32.5°C ± 2.5°C. A la fin de l'incubation, le résultat se fait par lecture visuelle d'un trouble ou non du milieu de culture. Un trouble signifie que le micro-organisme est inhibé par l'HE mais

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

survit alors qu'un non trouble signifie que le micro-organisme est détruit par l'HE. Le rapport CMB/CMI donne le résultat final d'efficacité de l'HE.

Les conditions ont été réalisées en n=3 pour les HE testées.

Pour le test DPPH :

Le test DPPH est la méthode la plus rapide et la plus utilisée pour une estimation de la capacité antioxydante d'extraits végétaux. Le radical stable DPPH[•] permet de mesurer la capacité anti-radicalaire de molécules pures ou d'extraits (ici de type HE) dans un milieu. Le réactif est de couleur violette et devient jaune lorsqu'il est réduit en 2,2-Diphényl-1- Picrylhydrazine (DPPH-H), c'est-à-dire, après transfert d'hydrogène des molécules antioxydantes (AH, composés phénoliques généralement). Lorsque qu'il est réduit, donc de couleur jaune, l'absorbance mesurée à 517 nm est relativement plus basse qu'initialement. Plus la valeur de l'absorbance de l'échantillon est basse, plus cela démontre alors la propriété antioxydante de l'échantillon testé.

• Traitement des données

Les données brutes sont transférées et traitées sous les logiciels Microsoft Excel[®] et/ou PRISM[®].

Formules pour le test anti-inflammatoire :

$$\text{Ecart Standard de la Moyenne (sem)} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Les comparaisons intergroupes, par rapport au contrôle des cellules non traitées, ont été réalisées à l'aide du test One-way ANOVA, « analyse of variance » en complément du post test Dunnett, sur le logiciel PRISM.

Données du P value (P), seuil de significativité statistique :

- ns : < 0.05, Non significatif
- * : 0.01 à 0.05, Significatif
- ** : 0.001 à 0.01, Très significatif
- *** : < 0.001, Extrêmement significatif

Formules pour le test anti-bactérien :

Rapport valeur %HE CMB/CMI :
 CMB < 5 CMI l'HE est très efficace.

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

CMB > 10 CMI, l'HE est peu efficace.

Formules pour le test DPPH :

Capacité antioxydante de l'échantillon (% inhibition du DPPH) = [(Absorbance témoin – Absorbance échantillon)/ Absorbance témoin]x100 à 517nm

Moyenne des absorbances sur 3 puits.

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

3.2.3 RESULTATS

Pour le test anti-inflammatoire :

Dans le cas du modèle cellulaire de type cellule épithéliale humaine de poumon, les A549-Dual :

• Validation des contrôles sur A549-D

- ✓ en condition non stimulée au TNF, une croissance et une morphologie microscopique normale est observée. De plus, la DO_{620nm} observée lors du test Quanti-Blue™ est minimale, proche de 0.1. Cette valeur est considérée comme un état non inflammatoire de la cellule.
- ✓ en condition stimulée par le TNF à 10ng/ml, une croissance et une morphologie microscopique normale est observée. De plus, la DO_{620nm} observée lors du test Quanti-Blue™ est maximale, proche de 0.45. Cette valeur est considérée comme un état pro-inflammatoire de la cellule.

Ces résultats sont attendus et permettent de valider les tests avec les HE.

• Résultats des huiles essentielles sur A549-D

- ✓ en condition non stimulée au TNF à 10ng/ml :
 - une croissance et une morphologie microscopique normale est observée pour **REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1.**
 - la DO_{620nm} observée lors du test Quanti-Blue™ est **non significative** par rapport au témoin de cellules non stimulées et donc non inflammatoire pour **REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1.**

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

- ✓ en condition stimulée par le TNF à 10ng/ml :
 - une croissance et une morphologie microscopique normale est observée pour **REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1** et **REU-g-HD1**.
 - la DO_{620nm} observée lors du test Quanti-Blue™, par rapport au témoin de cellules stimulées, est plus basse de manière **extrêmement significative** pour les HE **REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1** ce qui indique un effet anti-inflammatoire de ces HE.
 - la DO_{620nm} observée lors du test Quanti-Blue™, par rapport au témoin de cellules stimulées, est **non significative** pour l'HE **REU-g-HD1** ce qui n'indique pas d'effet anti-inflammatoire de cette HE.

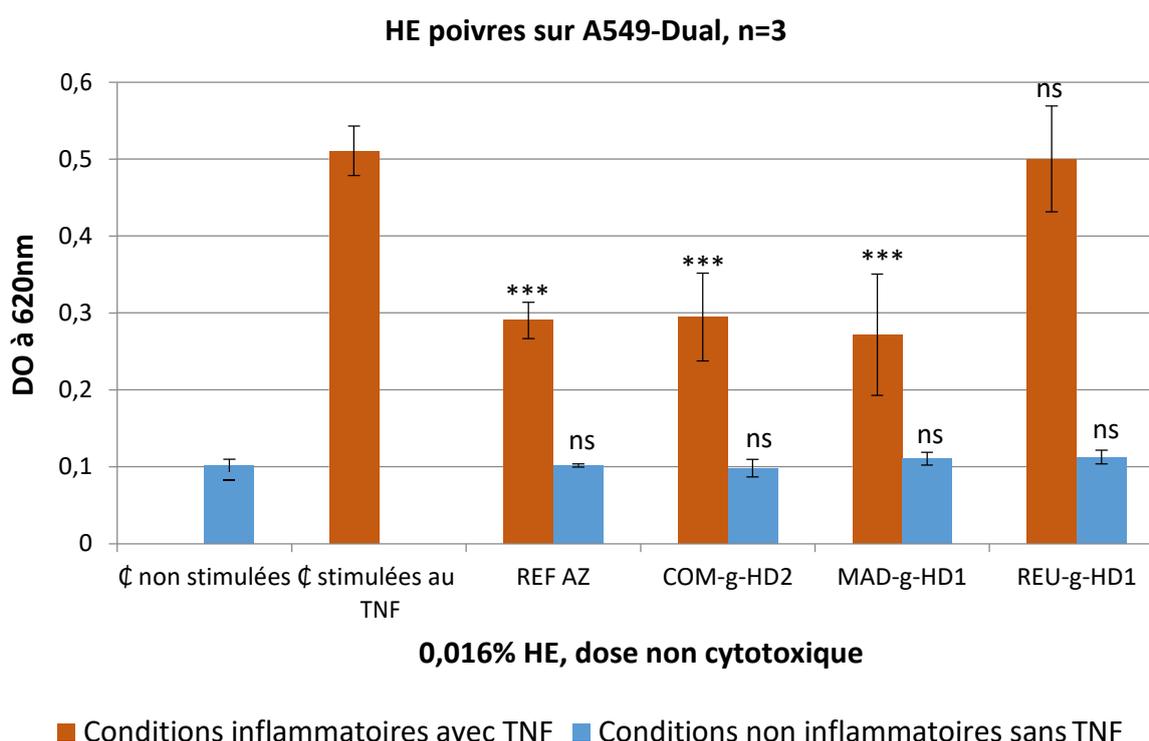


Figure 3.2.B : test Quanti-Blue™ sur cellules stimulées ou non au TNF à 10ng/ml ainsi que sur les cellules en contact avec les HE **REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1** et **REU-g-HD1** à 0.016% et avec ou sans stimulation au TNF.

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

Pour le test anti-bactérien :

• Validation du contrôle antimicrobien

Pour les 4 souches testées, la CMB est inférieure à 5 fois la CMI. L'HE de cannelle de Ceylan est **très efficace** :

Souche	Résultat CMI % HE	Calcul 5 fois CMI % HE	Résultat CMB % HE	Efficacité
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8789	0.16	0.8	0.16	HE Très efficace
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0.08	0.4	0.31	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	2.5	12.5	5	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.16	0.8	0.16	

Ces résultats sont attendus et permettent de valider les tests avec les HE de poivre.

• Résultats des huiles essentielles sur micro-organismes

- Pour les 4 souches testées la CMB est supérieure à 10 fois la CMI
- Les HE **REF AZ**, **COM-g-HD2**, **MAD-g-HD1** et **REU-g-HD1** aux concentrations testées **sont peu ou pas efficaces** sur les souches :
 - *Escherichia coli* ATCC 8789
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
 - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
 - *Candida albicans* ATCC 10231

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
	Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020

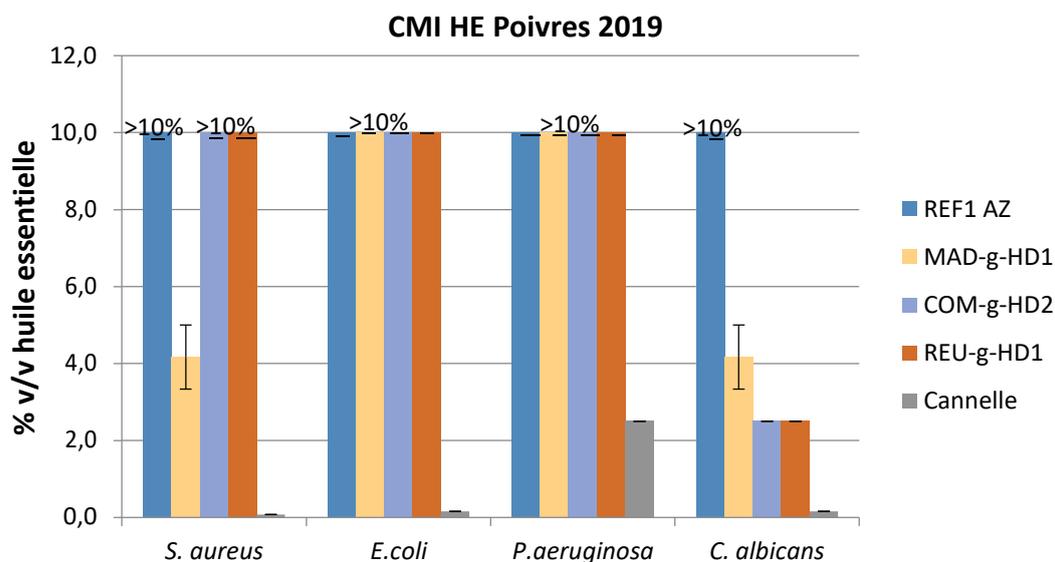


Figure 3.2.C : test CMI en milieu liquide des HE REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1 en contact avec les souches microbiennes *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* après 18-24h d'incubation à 32.5°C ± 2.5°C ainsi que du contrôle positif, la Cannelle de ceylan.

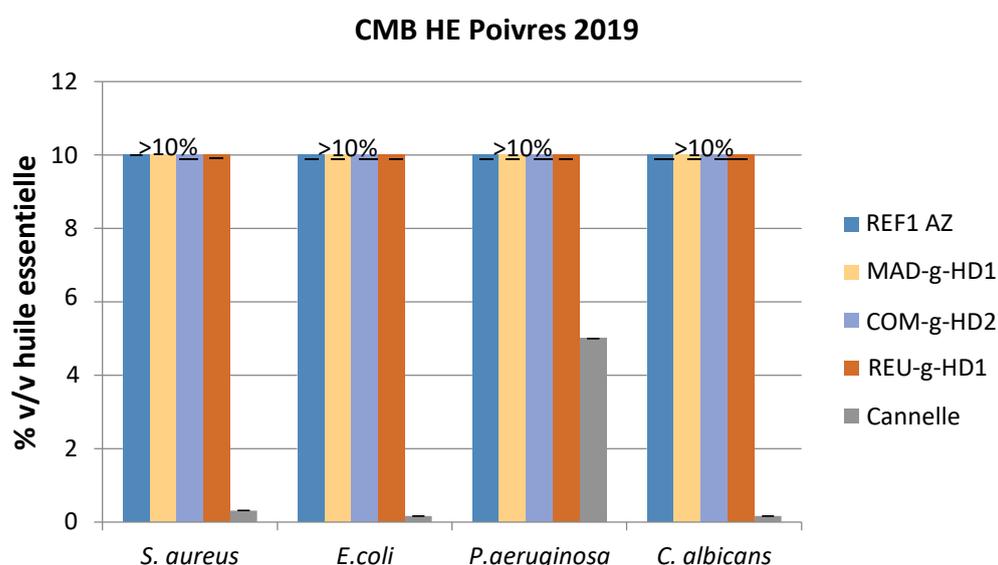


Figure 3.2.D : test CMB en milieu liquide des HE REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1 en contact avec les souches microbiennes *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* après 48h d'incubation à 32.5°C ± 2.5°C suivant la CMI ainsi que du contrôle positif, la Cannelle de ceylan.

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

Pour le test DPPH :

- Validation de la référence Trolox**

La référence Trolox présente des valeurs corrélées avec la concentration (régression linéaire 0 à 1mM, $y = 117.86x + 0.6359$, $r^2 = 0.9997$).

- Résultats des huiles essentielles**

Les HE de poivres ont dû être testées à des forts pourcentages pour pouvoir mesurer une inhibition du DPPH, ce qui confirme leur faible potentiel antioxydant. Pourtant ce test est généralement sensible et requiert de faibles volumes, ce qui n'a pas été le cas ici. Les valeurs d'inhibition de l'ordre 50% sont obtenues pour le pourcentage de 1.25% (v/v) pour les poivres sauvages REU-g-HD1, COM-g-HD2 et MAD-g-HD1, tandis qu'il est de 5% (v/v) pour l'HE de poivre noir (REF-g-HD1 et commercial REF-ARZ). Il a été choisi de ne pas utiliser plus de volume d'HE pour ce test.

	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009	BIO.DOT.001.A	Date de mise à jour : 31/01/2020	

3.2.4 CONCLUSION

Pour le test anti-inflammatoire :

Sur les cellules épithéliales humaines de poumon, les A549-Dual, à la concentration la plus forte et non cytotoxique, soit 0.016%, les huiles essentielles, **REF AZ** (commerciale Aromazone) et de poivres (HE produite à partir des graines), **COM-g-HD2** (Comores hydro distillation) et **MAD-g-HD1** (Madagascar hydro distillation) ont un effet très significativement anti-inflammatoire.

Par contre, l'huile essentielle de poivre (HE produite à partir des graines) **REU-g-HD1** (Réunion hydro distillation) n'a pas d'effet anti-inflammatoire.

Pour le test anti-bactérien :

Les huiles essentielles **REF AZ** (commerciale Aromazone) et de poivres (HE produite à partir des graines), **COM-g-HD2** (Comores hydro distillation), **MAD-g-HD1** (Madagascar hydro distillation) et **REU-g-HD1** (Réunion hydro distillation) n'ont pas d'effet antimicrobien à la concentration maximale testée, 10% en HE, sur les souches :

- *Escherichia coli* ATCC 8789
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Candida albicans* ATCC 10231

Il est à noter que la levure *C. albicans* est plus sensible aux HE de poivres hors celle du commerce (Aromazone) par rapport aux autres souches testées. Ainsi que la bactérie GRAM négatif *S. aureus* pour l'HE **MAD-g-HD1**. Cependant, ces concentrations ainsi que le rapport CMB/CMI ne sont pas suffisants pour un effet antimicrobien à application cosmétique ou agroalimentaire par exemple.

Pour le test DPPH :

Les huiles essentielles de graines de poivres sauvages de La Réunion, des Comores et de Madagascar présentent un potentiel plus important que celle du poivre noir en termes de capacité antioxydante (IC50= 1.25% et 5% respectivement). En revanche, ces pourcentages restent très importants et donc confirment un effet très faible et peu intéressant en termes d'application. Le profil analytique en composés volatils oxygénés est certainement corrélé à ce résultat et sera à vérifier. Il est probable que des extraits par solvants produits à partir des graines et feuilles aient en revanche un meilleur potentiel antioxydant.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

Données complémentaires 3.2.A Tableau des valeurs et observations test anti-inflammatoire

Tableau 3.2.1 : Effet anti-inflammatoire des HE REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1 à 0.016% sur les cellules A549-Dual après 24 heures d'incubation avec ou sans TNF

Conditions non inflammatoires, sans TNF				
HE Testées à 0.016%	Données normalisées			Observations microscopiques
	n=3 MOY DO 620nm	sem	P value	24h après traitement
Cellules non stimulées	0,102	0,008	/	+
REF AZ	0,102	0,002	ns	+
COM-g-HD2	0,098	0,012	ns	+
MAD-g-HD1	0,110	0,008	ns	+
REU-g-HD1	0,113	0,009	ns	+
Conditions non inflammatoires, AVEC TNF				
HE Testées à 0.016%	Données normalisées			Observations microscopiques
	n=3 MOY DO 620nm	sem	P value	24h après traitement
TNF	0,511	0,032	/	+
REF AZ	0,290	0,024	***	+
COM-g-HD2	0,295	0,057	***	+
MAD-g-HD1	0,272	0,079	***	+
REU-g-HD1	0,500	0,069	ns	+

Légende

+ : population normale

Données du P value (P), seuil de significativité statistique :

ns : < 0.05, Non significatif

* : 0.01 à 0.05, Significatif

** : 0.001 à 0.01, Très significatif

*** : < 0.001, Extrêmement significatif

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique	Date de création : 25/04/2019
			Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009

Données complémentaires 3.2.B Tableaux des valeurs CMI et CMB

Tableau 3.2.2 : valeurs des résultats **CMI** en % HE REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1 testées sur les 4 souches après 18-24 heures d'incubation

HE	Souche							
	S.aureus		E.coli		P.aeruginosa		C.albicans	
	MOY	SEM	MOY	SEM	MOY	SEM	MOY	SEM
REF1 AZ	>10	0	>10	0	>10	0	>10	0
MAD-g-HD1	4,17	0,83	>10	0	>10	0	0	0
COM-g-HD2	10	0	>10	0	>10	0	0	0
REU-g-HD1	>10	0	>10	0	>10	0	0	0
Cannelle de Ceylan	0,08	0	0,16	0,05	0,07	0,04	0,06	0,01

Tableau 3.2.3 : valeurs des résultats **CMB** en % HE REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1 testées sur les 4 souches après 48 heures d'incubation suivant la CMI.

HE	Souche							
	S.aureus		E.coli		P.aeruginosa		C.albicans	
	MOY	SEM	MOY	SEM	MOY	SEM	MOY	SEM
REF1 AZ	>10	0	>10	0	>10	0	>10	0
MAD-g-HD1	>10	0	>10	0	>10	0	>10	0
COM-g-HD2	>10	0	>10	0	>10	0	>10	0
REU-g-HD1	>10	0	>10	0	>10	0	>10	0
Cannelle de Ceylan	0,31	0	0,16	0	5,00	0	0,16	0

 <p>CYROI Recherche Santé Bio-innovation</p>	<p>RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages</p>	<p>CYROI Unité BIO'R / Unité Analytique</p>	<p>Date de création : 25/04/2019</p>
<p>Prestation pour le CIRAD Devis n° D201800009</p>	<p>BIO.DOT.001.A</p>	<p>Date de mise à jour : 31/01/2020</p>	

Données complémentaires 3.2.C Tableaux des valeurs de pourcentage d'inhibition du DPPH

Tableau 3.2.3 : valeurs en pourcentage d'inhibition DPPH des concentrations testées d'HE de graines de poivres sauvages **COM-g-HD2**, **MAD-g-HD1** et **REU-g-HD1** en comparaison avec le poivre noir **REF-HD1** et **REF-AZ**

% HE (v/v)	0,15	0,31	0,63	1,25	2,5	5
REU-g-HD1	7	10	30	48	72	86
MAD-g-HD1	17	16	32	50	86	84
COM-g-HD2	21	22	38	52	67	80
REF-g-HD1	9	7	14	27	35	51
REF-AZ	9	5	10	22	30	50

n.b. : En gras une estimation des IC50 en % HE v/v

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

3.3 TEST DE CYTOTOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES SUR CELLULES HUMAINES

Etude de la dose la plus forte et non cytotoxique des HE des différents poivres sauvages vs HE témoin en vue du test anti-inflammatoire

	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re		
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019	
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020	

3.3.1 Introduction

A la demande du porteur de projet, il a été demandé d'étudier :

- Au maximum :
 - 3 lots de poivres * 1 compartiment * 2 techniques (HD/MW) = 6 HE
 - + 1 témoin

Soit 7 échantillons pour les tests cytotoxiques Ou

bien

- Au minimum :
 - 3 lots de poivres * 1 compartiment * 1 seule technique = 3 HE
 - + 1 témoin

Soit 4 échantillons pour les tests cytotoxiques

Concernant les tests cytotoxiques, nous avons retenu l'étude des effets cytotoxiques sur cellules in vitro avec 3 lots de poivres et 1 témoin, soit 4 échantillons pour les tests :

- 1 lot de poivre de Madagascar * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé MAD-g-HD1**
- 1 lot de poivre des Comores * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé COM-g-HD2**
- 1 lot de poivre de la Réunion * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé REU-g-HD1**
- 1 lot de poivre du commerce Aromazone * compartiment graines * technique Hydro distillation, **nommé REF1 AZ**

Chaque HE est testé à des concentrations différentes et en n=3 répétitions techniques afin de déterminer la dose la plus forte et non cytotoxique des HE:

- test au rouge neutre sur lignée cellulaire tumorale humaine, les A549-Dual, réf a549d-nfis de chez InvivoGen ; étude de la viabilité cellulaire après traitement des cellules par HE, détermination de la dose la plus forte et non cytotoxique des HE sur cellules.
- confirmation de la dose la plus forte et non cytotoxique par le test LDH (Lactate Déshydrogénase) ; étude de la nécrose cellulaire après traitement des cellules par HE.

	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re		
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019	
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020	

ABREVIATIONS

ATCC	American Type Culture Collection
CO₂	Dioxyde de carbone
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
HD	Hydro Distillation
PBS	Phosphate Buffered Saline
Sem	Ecart Standard de la Moyenne
SN	Surnageant
SVF	Sérum de veau fœtal
TNF	Tumor Necrosis Factor

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019
			RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Prestation pour le CIRAD Devis n°

3.3.2 MATERIELS ET METHODES

- Modèle biologique tests *in-vitro* cellulaires**

Pour les tests de cytotoxicité :

- ✓ Type cellulaire : A549-Dual, réf a549d-nfis InvivoGen: cellule épithéliale humaine de poumon avec intégration d'un gène rapporteur SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase)
- ✓ Conditions de culture : 37°C, 5% CO₂
- ✓ Milieu de culture : DMEM complété avec

Composants :	Concentrations :
L-glutamine	2mM
Pénicilline	50 U/ml
Streptomycine	50 µg/mL
Sérum de veau fœtal	10% final
Sodium pyruvate	20 mM
Amphotéricine B	250 µg

- Composés testés, tests de cytotoxicité**

Les HE sont reçues en flacon de verre ambré et à +4°C.

Tableau 3.3.A : Récapitulatif des composés à tester :

HE testées	Test rouge neutre	Test LDH
	Concentrations testées	
MAD-g-HD1	0.063%	0.016%
COM-g-HD2	0.031	
REU-g-HD1	0.016	
REF1 AZ	0.008	
	0.004	

	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re		
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019	
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020	

• Choix du contrôle positif, tests de cytotoxicité

La cycloheximide est connue pour induire une mort cellulaire.

Suivant nos mises au point en GIP interne, la concentration retenue en cycloheximide pour induire une cytotoxicité significative est de 20 µg/ml.

Tableau 3.3.B : Récapitulatif du type cellulaire testé et de son contrôle cytotoxique

Cellule testée	Contrôle positif	Concentration testé	Durée du traitement
A549-Dual	Cycloheximide	20 µg/ml en milieu d'essai	24 heures

• Protocoles

Pour le test au rouge neutre :

✓ Culture et traitement

- Type cellulaire : A549-Dual en milieu d'essai
- Temps d'incubation : 24 heures à 37°C, 5% CO₂
- Paramètres d'évaluation : Internalisation du rouge neutre par les cellules viables et observations morphologiques des cellules au microscope inversé.

Les A549-Dual sont déposées en plaque 96 puits et sont cultivées en milieu de culture pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite traitées ou non (témoin des cellules non traitées) par les HE, par le solvant de solubilisation des HE le DMSO ou bien par le contrôle cytotoxique la cycloheximide. Puis les cellules sont incubées pendant 24 heures 37°C, 5% CO₂.

Les conditions ont été réalisées en n=3.

A la fin du traitement, les cellules sont incubées en présence de rouge neutre pendant 2 à 4 heures. L'internalisation cellulaire dépend de sa capacité à maintenir son PH grâce à la production d'ATP. Les cellules non viables ne sont pas capables d'internaliser le colorant. Après l'incubation et la lyse cellulaire, la densité optique (DO) représentative du nombre de cellules viables est mesurée avec un lecteur de microplaques TECAN à 540nm.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

Tableau 3.3.C : Synthèse des conditions expérimentales

Type cellulaire	Dosage	Référence cytotoxique
A549-Dual	Coloration au rouge neutre	Cycloheximide 20µg/ml

Pour le test LDH :

- ✓ Culture et traitement
 - Type cellulaire : A549-Dual en milieu d'essai
 - Temps d'incubation : 24 heures à 37°C, 5% CO₂
 - Paramètres d'évaluation : mesure par dosage colorimétrique de l'activité de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytosolique soluble qui est libérée dans le milieu de culture lors de la mort cellulaire due à l'endommagement de la membrane plasmique. L'augmentation de l'activité LDH dans le surnageant est proportionnelle au nombre de cellules lysées.

A partir de la plaque 96 puits qui est utilisée pour le test au rouge neutre, à la fin du traitement de 24h, chaque surnageant de cellules est prélevé et mis en nouvelle plaque 96 puit puis conservé au -80°C en vue du choix des concentrations à analyser.

Suite au traitement des données du test au rouge neutre, pour chaque HE, les puits contenant la concentration la plus forte et non cytotoxique en HE est sélectionnée pour le test LDH.

A partir du surnageant de cellule sélectionné grâce au rouge neutre, nous ajoutons un cocktail de réaction contenant du lactate, du NAD⁺ et du sel de tétrazolium (INT). La LDH catalyse la réduction de NAD⁺ en NADH en présence de L-lactate, tandis que la formation de NADH peut être mesurée dans une réaction couplée dans laquelle l'INT est réduit en un produit rouge, le formazan. La quantité de formazan est mesurée à 490 nm avec un lecteur de plaque TECAN.

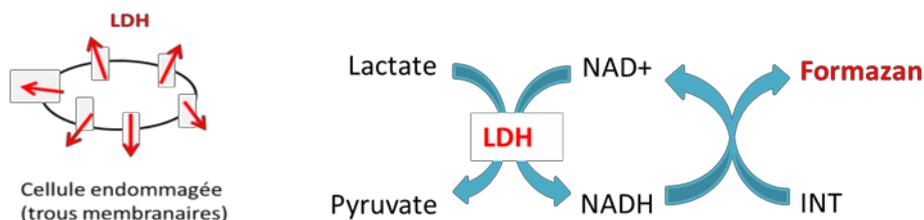


Figure 3.3.A : réaction colorimétrique en présence de LDH si la cellule subit une nécrose.

 Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re		
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019	
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020	

Tableau 3.3.D : Synthèse des conditions expérimentales

Type cellulaire	Dosage	Référence cytotoxique
A549-Dual	Méthode colorimétrique	Cycloheximide 20µg/ml

• Traitement des données, tests de cytotoxicité

Les données brutes sont transférées et traitées sous les logiciels Microsoft Excel® et/ou PRISM®.

$$\text{Ecart Standard de la Moyenne (sem)} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Les comparaisons intergroupes, par rapport au contrôle des cellules non traitées, ont été réalisées à l'aide du test One-way ANOVA, « analyse of variance » en complément du post test Dunnett, sur le logiciel PRISM.

Données du P value (P), seuil de significativité statistique :

ns : < 0.05, Non significatif

* : 0.01 à 0.05, Significatif

** : 0.001 à 0.01, Très significatif

*** : < 0.001, Extrêmement significatif

	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

3.3.3 RESULTATS

Pour le test au rouge neutre :

- Validation des contrôles sur A549-D**

Dans le cas du modèle cellulaire de type cellule épithéliale humaine de poumon les A549-Dual:

- ✓ en condition non traitée une croissance et une morphologie microscopique normale est observée. Ce contrôle correspond au témoin de cellules 100% viables
- ✓ en condition traitée avec le DMSO à 0.1%, une croissance et une morphologie microscopique normale est observée. Ce contrôle permet de vérifier la non cytotoxicité du solvant utilisé pour solubiliser les HE :
 - résultat non significatif par rapport au contrôle des cellules non traitées
- ✓ le traitement par la cycloheximide à 20µg/ml induit une mort cellulaire caractérisée par une modification de la morphologie cellulaire suivie d'une lyse (fragments de cellules) :
 - résultat extrêmement significatif par rapport au contrôle des cellules non traitées

Ces résultats étaient attendus et permettent de valider les tests.

Données complémentaires 3.3.A, tableau 3.3.1

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

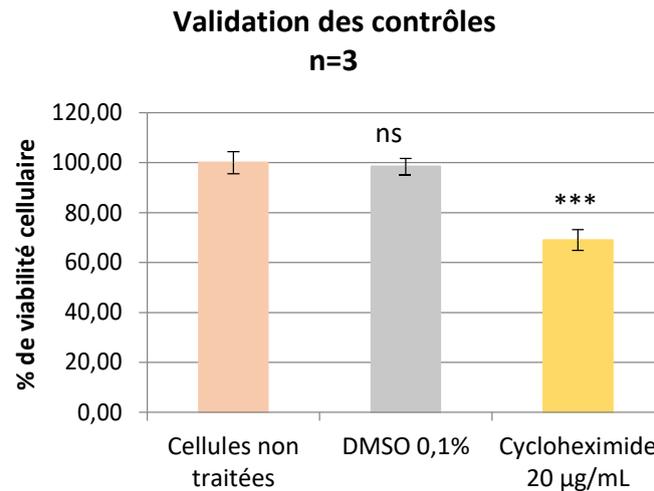


Figure 3.3.B : mesure de la cytotoxicité (rouge neutre) sur les A549-Dual non traitées comme contrôle négatif, traitées au DMSO comme contrôle du solvant et traitées à la cycloheximide à 20µg/ml comme contrôle positif.

● Résultats des huiles essentielles sur les A549-Dual

Observations microscopiques :

Dans les conditions expérimentales de cette étude après 24 heures de traitement, lors des observations microscopiques :

- A 0.063 et 0.031% en HE **MAD-g-HD1**, **COM-g-HD2** et **REU-g-HD1** et seulement à 0.063% en **REF1 AZ**, nous observons une croissance et une morphologie microscopique normale mais autant d'autres cellules avec un aspect morphologique modifié qui suggère un dysfonctionnement cellulaire.
- A partir de 0.016% jusqu'à 0.004% pour toutes les HE, nous observons une croissance et une morphologie microscopique normale.

Le résultat au rouge neutre suggère que les HE sur les cellules A549-Dual :

- est non significativement cytotoxique aux concentrations testées de 0.016 à 0.004% pour toutes les HE.
- est extrêmement significativement cytotoxique aux concentrations de 0.063 et 0.031% pour toutes les HE.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

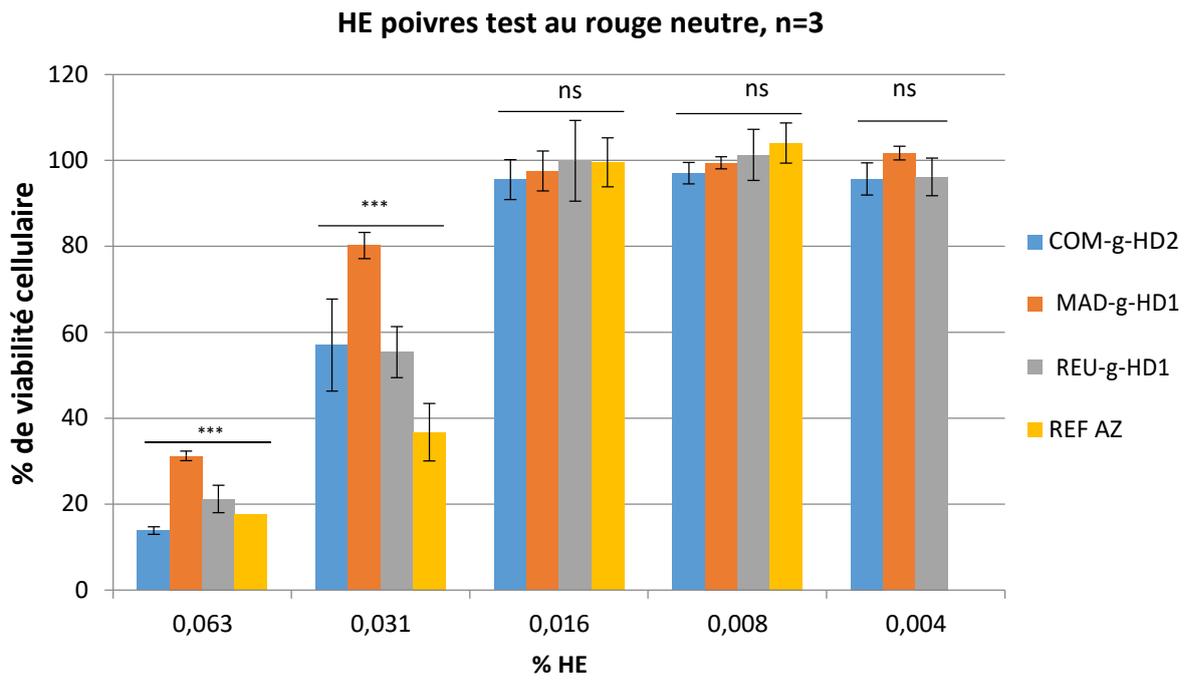


Figure 3.3.C : mesure de la cytotoxicité sur les A549-dual après 24h de traitement par les HE **MAD-g-HD1**, **COM-g-HD2**, **REU-g-HD1** et **REF1 AZ** à 0.063, 0.031, 0.016, 0.008 et 0.004%.

Pour le test LDH :

• **Validation des contrôles sur A549-D**

Données complémentaires 3.3.B, tableau 3.3.2

A partir de chaque surnageant de culture cellulaire dans le cas du modèle de type cellule épithéliale humaine de poumon les A549-Dual:

- ✓ en condition non traitée, la DO à 490nm correspond au témoin de cellules 100% viables et indique la valeur de non cytotoxicité comme référence
- ✓ en condition traitée avec le DMSO à 0.1%:
 - résultat non significatif par rapport au contrôle des cellules non traitées
- ✓ en condition traitée par la cycloheximide à 20µg/ml:
 - résultat extrêmement significatif par rapport au contrôle des cellules non traitées

Ces résultats étaient attendus et permettent de valider le test.

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

● **Résultats des huiles essentielles sur les A549-Dual**

Le résultat au LDH suggère que les HE sur les cellules A549-Dual est non significativement cytotoxique à la concentration testée de 0.016% pour toutes les huiles essentielles REF AZ (commerciale Aromazone) et de poivres (HE produite à partir des graines), COM-g-HD2 (Comores hydro distillation), MAD-g-HD1 (Madagascar hydro distillation) et REU-g-HD1 (Réunion hydro distillation).

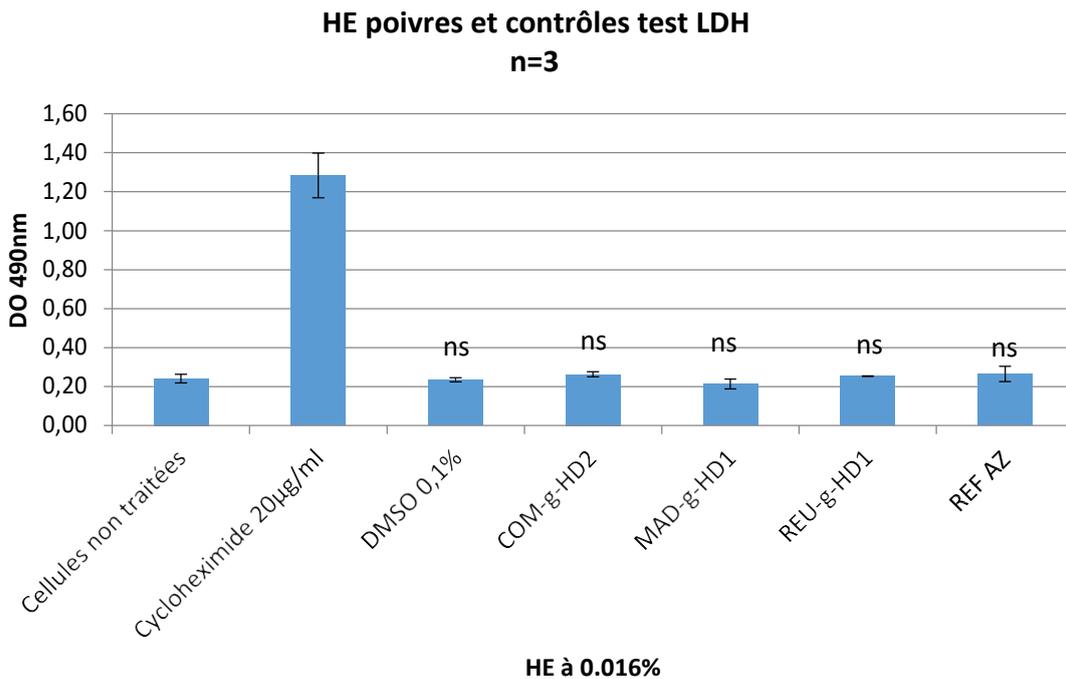


Figure 3.3.D : mesure de la cytotoxicité (LDH) sur les A549-Dual non traitées comme contrôle négatif, traitées au DMSO comme contrôle du solvant et traitées à la cycloheximide à 20µg/ml comme contrôle positif.

	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n°	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

3.2.4 CONCLUSION TESTS CYTOTOXIQUES

Pour le test au rouge neutre :

Sur les cellules épithéliales humaines de poumon, les A549-Dual, la concentration la plus forte et non cytotoxique déterminée pour les huiles essentielles **REF AZ** (commerciale Aromazone) et de poivres (HE produite à partir des graines), **COM-g-HD2** (Comores hydro distillation), **MAD-g-HD1** (Madagascar hydro distillation) et **REU-g-HD1** (Réunion hydro distillation) est de 0.016%.

Dose la plus concentrée et non cytotoxique pour les HE : 0.016%

Cette concentration a permis de tester l'efficacité des huiles essentielles sur leur potentiel effet anti-inflammatoire, partie 3.2 tests d'efficacité et à une dose la plus forte et non cytotoxique.

Pour le test LDH :

Afin de confirmer le résultat de non cytotoxicité au rouge neutre, le test complémentaire utilisé est le LDH.

Il a permis de montrer que la concentration déterminée avec le rouge neutre est bien non cytotoxique. Soit à la concentration de 0.016% pour toutes les huiles essentielles testées.

Dose la plus concentrée et non cytotoxique pour les HE : 0.016%

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 	RAPPORT D'ETUDE	Unité BIO'R	Date de création :
			Qualinnov II		25/04/2019
			Projet Poivres Sauvages		
			Prestation pour le	BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ :
			CIRAD Devis n°		31/01/2020

Données complémentaires 3.3.A Tableau des valeurs et observations test anti-inflammatoire

Tableau 3.3.1 : Effet cytotoxique des HE REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1 de 0.063 à 0.004% sur les cellules A549-Dual après 24 heures d'incubation

Traitement		Données normalisées			Observations microscopiques
Echantillons testés	Concentration échantillons	MOY % viabilité cellulaire 24h	P value	SEM	24h après traitement
Cellules non traitées	/	100	/	4,46	+
DMSO	0.1%	98,46	ns	3,20	+
Cycloheximide	20µg/ml	69,01	***	4,16	0
REF AZ	0.063%	17,61	***	0,78	0+
	0.031%	36,73	***	6,68	+
	0.016%	99,55	ns	5,69	+
	0.008%	104,01	ns	4,69	+
COM-g-HD2	0.063%	13,84	***	0,91	0+
	0.031%	57,00	***	10,70	0+
	0.016%	95,53	ns	4,65	+
	0.008%	97,01	ns	2,50	+
	0.004%	95,70	ns	3,74	+
MAD-g-HD1	0.063%	10,77	***	1,10	0+
	0.031%	50,62	***	3,03	0+
	0.016%	70,65	ns	4,66	+
	0.008%	71,16	ns	1,40	+
	0.004%	73,03	ns	1,57	+
	0.063%	21,21	***	3,20	0+

 Recherche Santé Bio-innovation		GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 
RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages		Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019
Prestation pour le CIRAD Devis n°		BIO.DOT.001.A	Dates de MAJ : 31/01/2020

REU-g-HD1	0.031%	55,40	***	5,95	0+
	0.016%	99,92	ns	9,40	+
	0.008%	101,29	ns	5,96	+
	0.004%	96,16	ns	4,40	+

Légende

+ : aspect morphologique normal
0 : aspect morphologique changé

 CYROI Recherche Santé Bio-innovation	GIP CYROI 2 rue Maxime Rivière, 97490 SAINTE-CLOTILDE Tél : 02.62.93.88.00 www.cyroi.re	 	Unité BIO'R	Date de création : 25/04/2019
			RAPPORT D'ETUDE Qualinnov II Projet Poivres Sauvages	Prestation pour le CIRAD Devis n°

Données complémentaires 3.3.B Tableau des valeurs et observations test anti-inflammatoire

Tableau 3.3.2 : Effet cytotoxique des HE REF AZ, COM-g-HD2, MAD-g-HD1 et REU-g-HD1 0.016% sur les cellules A549-Dual après 24 heures d'incubation

Echantillons testés	Concentration échantillons	Données normalisées		
		MOY DO 460nm	P value	SEM
Cellules non traitées	/	0,23	/	0,01
DMSO	0.1%	0,24	ns	0,01
Cycloheximide	20µg/ml	1,48	***	0,05
REF-AZ	0.016%	0.27	ns	0.04
COM-g-HD2	0.016%	0.26	ns	0.01
MAD-g-HD1	0.016%	0.21	ns	0.03
REU-g-HD1	0.016%	0.26	ns	0

Données du P value (P), seuil de significativité statistique :

ns : < 0.05, Non significatif

* : 0.01 à 0.05, Significatif

** : 0.001 à 0.01, Très significatif

*** : < 0.001, Extrêmement significatif