

Détermination du/des mode(s) d'action et de l'origine de deux composés organiques volatils émis lors de l'intéraction entre l'orge et deux champignons pathogènes

Lucie Jallais

▶ **To cite this version:**

Lucie Jallais. Détermination du/des mode(s) d'action et de l'origine de deux composés organiques volatils émis lors de l'intéraction entre l'orge et deux champignons pathogènes. Sciences agricoles. 2016. dumas-01391976

HAL Id: dumas-01391976

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01391976

Submitted on 30 Nov 2016

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

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

AGROCAMPUS OUEST

☑ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

www.biovigpa.fr

Année universitaire : 2015 - 2016 Spécialité : Horticulture Spécialisation (et option éventuelle) : BioVIGPA-Pathologie et Interactions	**Mémoire de fin d'études** ☑ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Détermination du/des mode(s) d'action et de l'origine de deux composés organiques volatils émis lors de l'interaction entre l'orge et deux champignons pathogènes.

Par : Lucie Jallais

Soutenu à Poitiers, le 23 juin 2016

Devant le jury composé de :
Président : Pr Alain Bouchereau

Autres membres du jury :
Pr Benoit Saint-Pierre
Dr Rémi Lemoine
Pr Florence Val

Maître de stage : Caroline De Clerck
Enseignant référent : Olivier Le Prince

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation
«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»
disponible en ligne http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr

AGROCAMPUS OUEST

☑ **CFR Angers**

☐ **CFR Rennes**

www.biovigpa.fr

Année universitaire : 2015 - 2016 Spécialité : Horticulture Spécialisation (et option éventuelle) : BioVIGPA-Pathologie et Interactions	**Mémoire de fin d'études** ☑ d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage ☐ d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Détermination du/des mode(s) d'action et de l'origine de deux composés organiques volatils émis lors de l'interaction entre l'orge et deux champignons pathogènes.

Par : Lucie Jallais

Soutenu à Poitiers, le 23 juin 2016

Devant le jury composé de :
Président : Pr Alain Bouchereau

Autres membres du jury :
Pr Benoit Saint-Pierre
Dr Rémi Lemoine
Pr Florence Val

Maître de stage : Caroline De Clerck
Enseignant référent : Olivier Le Prince

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Ce document est soumis aux conditions d'utilisation
«Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de Modification 4.0 France»
disponible en ligne http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.fr

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité

☐ Non ☑ Oui si oui : ☑ 1 an ☐ 5 ans ☐ 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible [1].

Date et signature du maître de stage [2] :

Université de Liège
Gembloux Agro-Bio Tech
Unité de Phytopathologie, bât. 47
5030 Gembloux - Belgique

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant à renseigner).

Droits d'auteur

L'auteur[3] Lucie Jallais
autorise la diffusion de son travail (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☑ Oui ☐ Non

Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☑ la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

(Facultatif) ☐ accepte de placer son mémoire sous licence Creative commons CC-By-Nc-Nd (voir Guide du mémoire Chap 1.4 page 6)

Date et signature de l'auteur : 03/08/2016

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé (immédiatement ou à la fin de la période de confidentialité)

☑ Oui ☐ Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

☐ la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

☐ la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

☑ la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

29/8/2016

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.
(2) Signature et cachet de l'organisme

Table des matières

Remerciements....2

Abréviations et Acronymes....4

I- Introduction – Bibliographie....6

1) Le modèle d'étude : l'orge et deux champignons pathogènes (*F. culmorum, C. sativus*)....6

2) Les COVs : des messagers importants dans les interactions à distance entre organismes....10

3) Emission de COVs lors de l'interaction entre l'orge et *C. sativus*....14

4) Objectifs de l'étude....16

II- Matériels et Méthodes....18

1) Matériel biologique....18

2) Préparation de suspensions de spores en milieu liquide....18

3) Evaluation du relargage des ions potassium (K^+) dans le milieu extracellulaire....18

4) Evaluation du fonctionnement des pompes à protons (H^+) par la mesure de l'acidification du milieu induite par le glucose....20

5) Evaluation du pH intracellulaire des spores....20

6) Evaluation de l'intégrité membranaire en cytométrie de flux et microscopie à fluorescence....22

7) Prélèvement de molécules volatiles par Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) et analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)....24

8) Analyses statistiques....28

III- Résultats....30

1) Relargage des ions K^+ dans le milieu extracellulaire....30

2) Fonctionnement des pompes à protons (acidification du milieu induite par le glucose)....32

3) Modification du pH intracellulaire des spores....36

4) Maintien de l'intégrité membranaire des spores....36

5) Prélèvement de molécules volatiles par Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) et analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)....40

IV- Discussion....42

V- Conclusion et Perspectives....50

VI- Bibliographie....54

Remerciements

Avant de développer le sujet du stage qui m'a occupé pendant 6 mois, je tiens à adresser mes remerciements à l'ensemble des personnes ayant permis à mon stage de se dérouler dans d'excellentes conditions.

Tout d'abord, je tiens à remercier M. Haissam Jijakli de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine de Gembloux AgroBioTech pour mon stage de fin d'étude. Cette expérience m'a permis d'appréhender de façon très concrète le monde de la recherche et de développer mes compétences dans les diverses activités de laboratoire.

Mes remerciements sont tout particulièrement adressés à Caroline De Clerck pour son encadrement tout au long de ce TFE. Ta bonne humeur et ton enthousiasme ont rendu ces 6 mois de stage très agréables et très motivants ! J'ai beaucoup appris sur le travail en laboratoire grâce à tes conseils et à ton expérience. Merci également pour les nombreuses relectures apportées à ce rapport et pour la confiance que tu m'as accordé tout au long du stage.

Je tiens également à remercier Amine Kaddes pour son encadrement au cours du stage. C'était un plaisir de participer à l'acquisition des résultats pour ta thèse. Merci pour ton accueil. J'espère que mon travail te sera utile et te permettra d'avancer dans ton doctorat.

Plus généralement, je tiens à remercier toute l'équipe travaillant au laboratoire : techniciens, thésards, TFistes... Grâce à toute l'équipe, mon TFE s'est déroulé dans une ambiance joyeuse et agréable. Merci pour votre accueil, votre disponibilité et votre bonne humeur.

Merci enfin aux laboratoires de Chimie et de Bio-industrie de Gembloux AgrobioTech pour leur accueil mais surtout pour leur participation à l'acquisition des résultats de SPME, de cytométrie et de microscopie à fluorescence. Merci pour votre disponibilité et vos nombreux conseils.

Abréviations et Acronymes

COVs : Composés Organiques Volatils

FSC : Forward Scatter : paramètre permettant d'évaluer la taille des cellules en cytométrie de flux

SSC : Side Scatter : paramètre permettant d'évaluer la forme des cellules en cytométrie de flux

GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

GLVs : Green Leaves Volatiles. Volatils émis par les parties végétatives d'une plante.

HIPVs : Herbivore Induced Plant Volatiles. Volatils émis par les plantes et induits par l'attaque d'herbivores.

PBS : Phosphate Buffered Saline. Tampon Phosphate Salin.

PDA : Potato Dextrose Agar. Milieu de culture solide à base de dextrose de pomme de terre et d'agar.

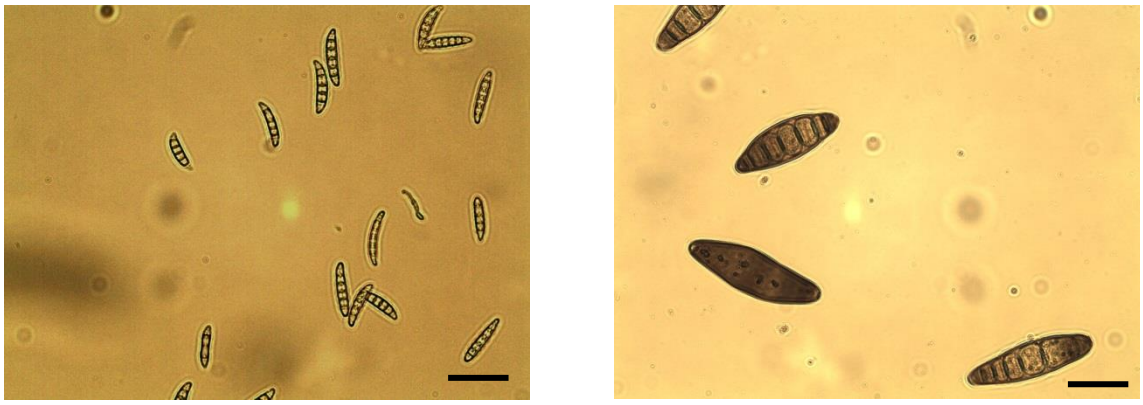
PDB : Potato Dextrose Broth. Milieu de culture liquide à base de dextrose de pomme de terre.

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Rhizobactérie favorisant la croissance des plantes.

SPME : Solid Phase Micro-Extraction. Technique d'extraction de molécules en phase solide.

YECSA : Yeast Extract Corn Starch Agar. Milieu de culture solide à base d'extrait de levure, d'amidon de maïs et d'agar.

YECSB : Yeast Extract Corn Starch Broth. Milieu de culture liquide à base d'extrait de levure, et d'amidon de maïs.



A B

Figure 1 : Spores de *F. culmorum* (A) et *C. sativus* (B) observées au microscope optique. Les spores de *F. culmorum* sont fusiformes et cloisonnées. Ce champignon ne forme que des macro-conidies mais leur taille est variable : 30–50µm de longueur, 5.0– 7.5 µm de largeur (Scherm *et al.*, 2013). Les spores de *C. sativus* sont de forme elliptique et sont cloisonnées. Leur taille est aussi très variable : 60 à 120µm de longueur et 12 à 20µm de largeur (Kumar *et al.*, 2002)**.** Echelle : 40µm.



Figure 2 : Semis dont le développement est ralenti par la pourriture racinaire (Mathre *et al.*, 2003)

I- Introduction – Bibliographie

Les Composés Organiques Volatils (COVs) sont des molécules volatiles d'origine naturelle ou anthropique. Lorsqu'elles sont naturelles, ces molécules peuvent être émises par les plantes mais aussi par des micro-organismes (bactéries, champignons,…). Une précédente étude menée au laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine (Fiers *et al.*, 2013) s'est intéressée aux COVs émis lors de l'interaction entre l'orge et deux champignons pathogènes majeurs dans cette culture : *Fusarium culmorum* et *Cochliobolus sativus*. Cette étude a montré qu'un ensemble de molécules volatiles est émis uniquement lorsque les racines de l'orge sont infectées par *C. sativus*. Cette étude a aussi démontré que ce bouquet de volatils émis *de novo* lors de l'interaction orge-*C. sativus* réduisait la croissance de *F. culmorum* mais aussi de *C. sativus*. Par la suite, les COVs constituant ce bouquet ont été testés individuellement. Parmi ceux-ci, deux molécules ont été sélectionnées pour leur action antifongique élevée. Il s'agit de deux esters : le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate. Ces deux esters présentent donc un intérêt dans le domaine de la protection des plantes. Cependant, l'origine fongique ou végétale de ces deux molécules est à l'heure actuelle inconnue, de même que leur(s) mode(s) d'action.

1) Le modèle d'étude : l'orge et deux champignons pathogènes (*F. culmorum*, *C. sativus*)

L'orge (*Hordeum vulgare*) fait partie des premières plantes domestiquées par l'homme (Ullrich, 2011). En 2014, cette culture représentait 146 millions de tonnes produites sur 49 millions d'hectares répartis dans le monde (FAO, 2014). L'orge est utilisée pour le fourrage mais aussi pour la production de malt pour la brasserie. Cette culture est soumise à de nombreux pathogènes dont deux champignons *C. sativus* et *F. culmorum* (Figure 1). Ces deux Ascomycètes sont les principaux agents de la pourriture racinaire ainsi que de la fonte des semis chez l'orge et le blé. Cette maladie provoque des dégâts importants sur ces deux cultures, mais les pertes de rendements sur l'orge s'avèrent plus élevées que sur blé (Ledingham *et al.*, 1973; Smiley *et al.*, 2005). Elles peuvent ainsi s'étendre de 16 à 33% pour les cultivars d'orge sensibles (Karov *et al.*, 2009).

Ces deux pathogènes s'attaquent aux semences et aux racines de la plante. Ils provoquent des lésions brunes pouvant s'étendre en lésions nécrotiques et provoquer un ralentissement du développement voire la mort du semis (Mathre *et al.*, 2003) (Figure 2). De plus, le pathogène *F. culmorum* produit des mycotoxines de la famille des trichothécènes capables d'inhiber les défenses de la plante (Wagacha and Muthomi, 2007). Ces molécules sont aussi toxiques pour

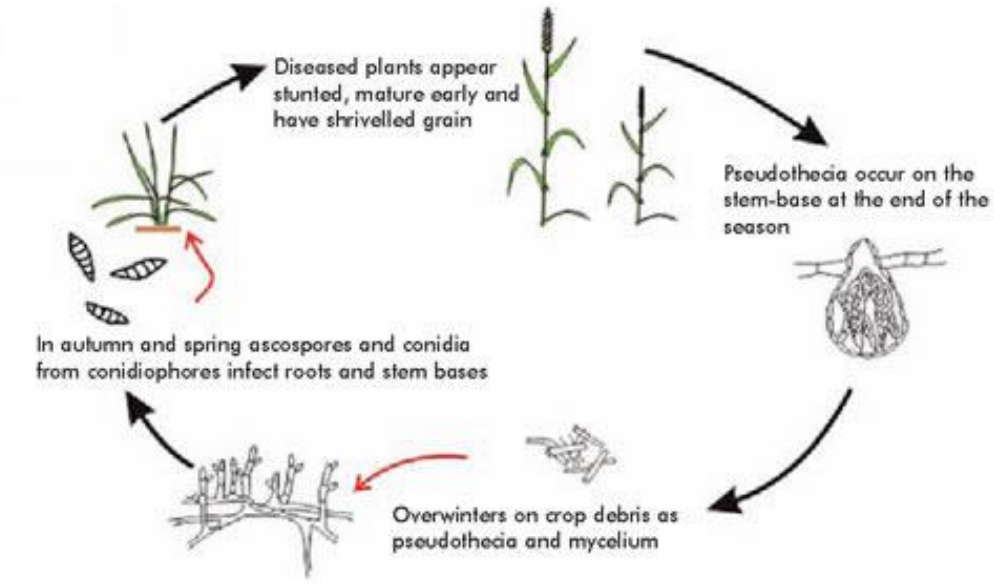


Figure 3 : Cycle de développement de *C. sativus* sur céréale (AHDB Cereals and Oilseeds, n.d.)**.** L'infection des racines et des tiges par les conidies/ascospores se produit en automne et au printemps à partir de champignons ayant passé l'hiver sur des débris de culture dans le sol. Les plantes atteintes présentent alors des symptômes d'arrêt de croissance au niveau des parties végétatives mais aussi du grain. A la fin de la saison des pseudothèces sont produits et passeront l'hiver sur les débris de cultures.

les animaux et les hommes, et rendent la consommation de la plante atteinte dangereuse (Scherm *et al.*, 2013).

La contamination de la culture par *C. sativus* se produit soit par des graines déjà infectées soit par la présence du champignon dans le sol, due à des débris de culture par exemple (Figure 3). L'infection est favorisée par des conditions de température et d'humidité élevées (Scherm *et al.*, 2013).

Différents moyens de lutte existent pour lutter contre ces deux champignons pathogènes. L'efficacité des fongicides chimiques est forte mais peut être influencée par de nombreux facteurs tels que l'humidité, la température et la période d'application (Wagacha and Muthomi, 2007). De plus certains fongicides augmentent la production de mycotoxines (D'Mello, 1997).

Devant l'inefficacité de certains fongicides chimiques et dans un contexte de diminution de ces produits, il est nécessaire de développer des méthodes alternatives.

Une possibilité serait de raisonner les pratiques culturales afin de diminuer la pression en pathogène en mettant par exemple en place des rotations avec une culture non céréalière, en contrôlant les mauvaises herbes, etc (Wagacha and Muthomi, 2007). L'utilisation de variétés résistantes est également possible pour lutter contre *F. culmorum* dans la culture de blé. Cependant, le niveau de résistance de ces variétés reste faible (Scherm *et al.*, 2013). Il n'existe pas actuellement de variété d'orge résistante à la pourriture racinaire.

Le développement de méthodes de biocontrôle est également un moyen de lutte possible. Le biocontrôle est un « ensemble de méthodes de protection des végétaux qui utilisent des mécanismes naturels ». Ils sont préparés soit à partir d'organismes vivants (champignons, bactéries, insectes,…), soit à partir de substances produites par ces organismes (phéromones, extraits végétaux,...) (INRA, 2016). Il est ainsi possible d'utiliser des agents antagonistes capables de diminuer l'incidence d'une maladie (Wagacha and Muthomi, 2007). Dans le cas de *F. culmorum*, des agents de biocontrôle ont été mis en évidence. Ainsi, le champignon *Clonostachys rosea* est capable de réduire la sporulation de ce pathogène sur blé et maïs (Luongo *et al.*, 2005; Roberti *et al.*, 2008). La bactérie *Pseudomonas fluorescens,* quant à elle, provoque l'inhibition de sa croissance sur seigle (Kurek and Jaroszuk-Scisel, 2003). Certains antagonistes peuvent aussi diminuer la production de mycotoxines. C'est le cas de souches de

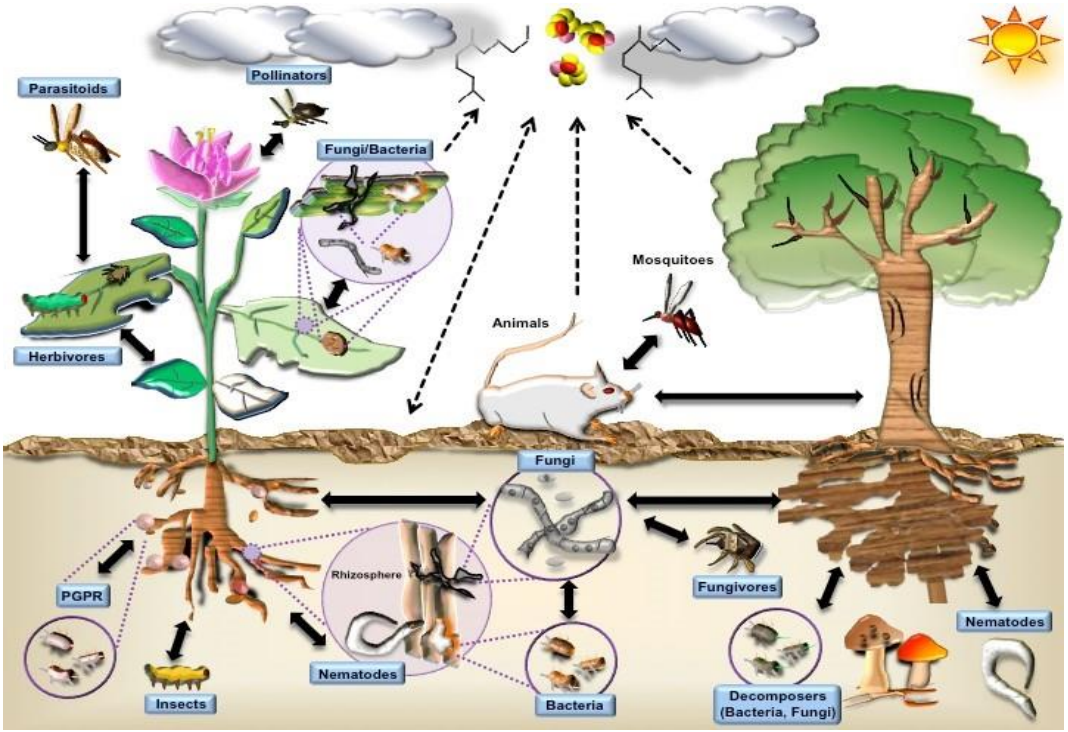


Figure 4 : Rôles hypothétiques et connus des COVs dans les interactions entre organismes (Bitas *et al.*, 2013)**.** Les doubles flèches représentent les interactions entre organismes faisant intervenir des COVs. Les COVs d'origine anthropique et biologique entrent dans l'atmosphère environnant, affectant la qualité de l'environnement et la santé de l'écosystème. Le sol fonctionne à la fois comme source et puit de COVs. Les COVs interviennent dans les interactions entre tous les organismes : plantes, macro et micro-organismes. Ils interviennent aussi bien dans des interactions hôte-pathogène que dans des interactions positives comme c'est le cas des bactéries PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) dont les COVs induisent la croissance de la plante et la résistance aux stress. Les COVs sont également des molécules clefs dans la reproduction des plantes en attirant les pollinisateurs et les disperseurs de graines.

Fusarium equiseti qui en plus de provoquer une diminution de la croissance du pathogène, provoquent aussi une diminution des mycotoxines produites sur blé (Luongo *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2004).

Depuis quelques années, les scientifiques s'intéressent aux COVs émis par certains micro-organismes et montrant des effets antifongiques et antibactériens pour le développement de nouvelles méthodes de biocontrôle. Ainsi, il a été montré que des bactéries du genre *Pseudomonas* par exemple, émettaient des volatils exerçant une action antifongique vis-à-vis de *Sclerotinia sclerotiorum* se traduisant par une inhibition de la croissance mycélienne et de la germination des spores du champignon (Fernando *et al.*, 2005). Les COVs constituent donc un levier d'action intéressant dans la lutte contre les champignons pathogènes et notamment contre *F. culmorum* et *C. sativus*.

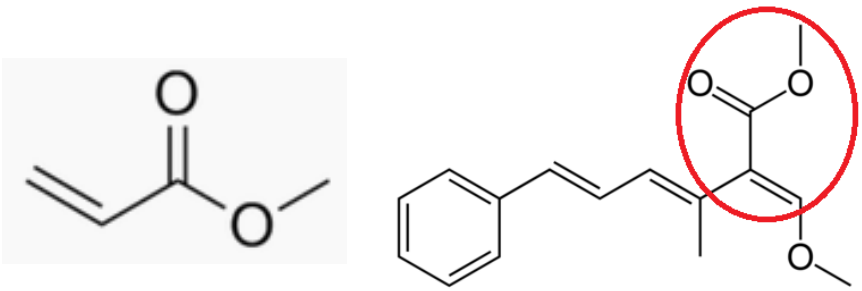
2) Les COVs : des messagers importants dans les interactions à distance entre organismes

Les composés organiques volatils sont des métabolites secondaires liposolubles et de faible poids moléculaire. Ils ont la capacité de traverser les membranes librement (Dudareva *et al.*, 2006). De par leur caractère volatil, les COVs jouent un rôle important dans les interactions à distance entre différents organismes : plantes, insectes, bactéries, champignons,… comme le montre la Figure 4. Les COVs aériens sont abondamment décrits dans la littérature (Macías-Rubalcava *et al.*, 2010; Ezra *et al.*, 2004; Strobel *et al.*, 2001) contrairement au COVs émis dans le sol dont l'étude n'a commencé que récemment (Delory *et al.*, 2016). De plus, l'étude des COVs, qu'ils soient aériens ou souterrains, concernent principalement des composés émis lors de l'interaction plante-herbivore (War *et al.*, 2011) .

Les COVs émis par la plante interviennent dans l'interaction avec de nombreux organismes et ont par conséquent de nombreux rôles (la reproduction, la défense vis-à-vis des herbivores, la stimulation des défenses des plantes voisines, la lutte contre les micro-organismes pathogènes). Ainsi, l'émission de molécules odorantes par les fleurs procure à certaines plantes un avantage reproductif. Elles attirent les insectes pollinisateurs spécifiques et les animaux capables de disperser les graines (Dudareva *et al.*, 2006). Mais les COVs émis par les plantes jouent également un rôle majeur dans les interactions plante-pathogène. Ainsi, les molécules volatiles dites HIPVs (Herbivore Induced Plant Volatiles) permettent à la plante de se défendre contre les herbivores qui l'attaquent (War *et al.*, 2011). Ces molécules comprennent deux principaux types de volatils : les GLVs pour Green Leaves Volatiles et les

terpenoïdes. Ces molécules sont très spécifiques de la plante qui les émet et de l'herbivore impliqué (Arimura *et al.*, 2009). Les HIPVs interviennent dans les défenses de la plante vis-à-vis des herbivores en empêchant leur oviposition (Pichersky and Gershenzon, 2002) mais aussi en attirant leurs ennemis naturels. Ce phénomène est appelé interaction tritrophique plante-herbivore-carnivore. C'est le cas par exemple de la plante *Phaseolus lunatus* qui lorsqu'elle est attaquée par l'acarien *Tertranychus urticae* émet des molécules volatiles attirant le prédateur naturel : *Phytoseiulus persimili* (Dudareva *et al.*, 2006). De plus, ce phénomène apparait non seulement sur les feuilles attaquées par l'herbivore mais aussi sur les feuilles ou les plantes voisines qui peuvent à leur tour émettre ces molécules pour se défendre (Pichersky and Gershenzon, 2002). L'exposition des plantes voisines aux HIPVs induit également un phénomène de priming leur permettant de répondre plus efficacement à une prochaine attaque d'herbivores (Dudareva *et al.*, 2006). Enfin, si les HIPVs permettent à la plante de se défendre contre les herbivores, ils lui permettent aussi de se défendre contre les micro-organismes qui pourraient infester le site de la blessure (Arimura *et al.*, 2009).

Les COVs émis par les micro-organismes peuvent avoir différentes actions positives ou négatives sur d'autres micro-organismes mais aussi sur les plantes. Une grande partie de ces COVs microbiens sont recensés dans la base de données : Microbial Volatile Organic Compound Database (mVOC) (Lemfack *et al.*, 2014). Il existe de nombreux cas de COVs fongiques possédant une activité antimicrobienne. C'est le cas du champignon endophyte *Muscodor albus* dont certains COVs inhibent la croissance de bactéries et champignons dont *Fusarium solani* et *Rhizoctonia solani* (Morath *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2012). C'est pour cette raison que ce champignon est utilisé en tant qu'agent de biocontrôle notamment sur le brocoli. Par ailleurs, certaines espèces de champignons et notamment des espèces de *Colletotrichum* émettent des composés volatils permettant d'inhiber leur propre croissance. Ces COVs sont appelés « self inhibitors ». Ils sont émis lorsque la colonie est trop grande ou que les conditions de croissance sont défavorables (Bennett *et al.*, 2012). D'autres champignons émettent des COVs qui leur fournissent un avantage compétitif. *Penicillium paneum* par exemple, émet le 1-octen-3-ol à la fois en tant que self-inhibitor mais aussi pour inhiber la croissance d'autres champignons et donc limiter la compétition avec ceux-ci (Chitarra *et al.*, 2005). En ce qui concerne les COVs bactériens, certaines espèces de *Pseudomonas* émettent également des COVs possédant une action antifongique, comme par exemple des poisons respiratoires inhibant la croissance de *Rhizoctonia solani* (Weisskopf, 2013). Mais, les bactéries produisent aussi des COVs pouvant influencer la croissance de la



A **B**

Figure 5 : Représentation du Méthyl Acrylate (A) et de la Strobilurine A (B). La partie cerclée de rouge représente le groupement semblable dans les deux molécules.

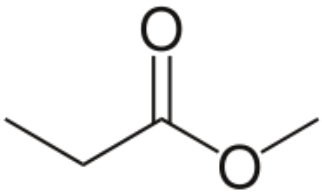


Figure 6 : Représentation du Méthyl Propionate

plante soit en la stimulant (bactéries PGPR : Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) (Bennett *et al.*, 2012) soit en l'inhibant. C'est le cas de *Serratia odorifera* qui inhibe la croissance d'*Arabidopsis thaliana* (Kai *et al.*, 2008).

3) Emission de COVs lors de l'interaction entre l'orge et *C. sativus*

Le potentiel élevé des COVs en matière de protection des plantes ont amené l'équipe de recherche de M. Fiers (2013) à s'intéresser à ces composés dans le cas de l'interaction entre l'orge et les deux principaux agents de la pourriture racinaire : *C. sativus* et *F. culmorum*. Leurs travaux ont permis de caractériser l'ensemble des COVs émis par les racines d'orge saines et chacun des deux pathogènes étudiés, mais aussi les COVs émis lors de l'interaction orge-pathogène. Un bouquet de volatils émis uniquement lors de l'interaction orge-*C. sativus* a été mis en évidence. Les auteurs ont alors montré que la mise en contact de ce bouquet de volatils avec les deux pathogènes provoque l'inhibition de leur développement. Les effets des composants majoritaires de ce bouquet de molécules ont alors été testés individuellement sur les pathogènes. Parmi ce bouquet de volatils, deux esters ont été retenus pour leur activité antifongique particulièrement forte. Ces molécules sont le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate. Ces deux COVs sont capables de provoquer 91% d'inhibition de la croissance mycélienne mais aussi de provoquer une inhibition de la germination des spores.

Le Méthyl Acrylate est une molécule dont la structure moléculaire présente un groupement chimique commun avec les strobilurines (Figure 5). Les strobilurines sont des molécules fongicides isolées à partir de champignons. Leur action antifongique est due à une inhibition de la respiration conduisant à la mort du pathogène (Balba, 2007). Le Méthyl Acrylate n'a encore jamais été référencé comme molécule intervenant dans la communication entre organisme (Pherobase, 2016). Le Méthyl Propionate (Figure 6) quant à lui est l'ester de l'acide propanoïque. L'acide propanoïque est connu pour ses propriétés antimicrobiennes et est pour cette raison utilisé en tant que conservateur en alimentation animale (Ricke, 2003). De plus, le Méthyl Propionate intervient dans la communication entre deux coléoptères *Pachylomerus femoralis* et *Keper lamarcki* (Burger *et al.*, 1995). Le Méthyl Propionate n'est pour le moment pas connu comme molécule ayant des propriétés antifongiques.

De par leurs propriétés antifongiques, l'approfondissement des connaissances sur ces molécules est intéressant.

4) Objectifs de l'étude

Le premier objectif de l'étude est de déterminer le mode d'action par lequel les molécules étudiées inhibent la croissance mycélienne et la germination des spores.

Les deux molécules étudiées sont émises uniquement lors de l'interaction entre les racines d'orge et le champignon pathogène *C. sativus*. L'origine fongique ou végétale du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate n'est pas encore connue. La plante pourrait émettre ces substances antifongiques dans le but de se défendre contre l'attaque du pathogène. L'agent pathogène quant à lui pourrait émettre ces molécules dans le but de limiter la compétition avec d'autres agents pathogènes, mais aussi de limiter sa population (phénomène de « self-inhibition ») (Breeuwer *et al.*, 1997; Chitarra *et al.*, 2005). La détermination de l'origine des deux COVs étudiés constitue ainsi le deuxième objectif de l'étude.

II- Matériels et Méthodes

1) Matériel biologique

Les souches de champignons utilisées pour les expériences présentées proviennent de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgique (BCCM/MUCL, n.d.). Il s'agit de :

- *C. sativus* : MUCL 46854. Sa culture est réalisée en boite de pétri sur milieu YECSA (Yeast Extract Corn Starch Agar) à 22±1°C et sous une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit. Le milieu se compose d'1g de potassium phosphate, 0.5g de magnésium sulfate, 4g d'extrait de levure, 15g d'amidon de maïs, 20g d'Agar pour 1L de milieu.
- *F. culmorum* : MUCL 28166. Sa culture est réalisée en boite de pétri sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, 39g de PDA par litre d'eau distillée) à 22±1°C et à l'obscurité.

Les cultures sont repiquées sur du milieu neuf tous les 7 jours.

La variété d'orge utilisée est une variété sensible à la pourriture racinaire appelée Quench.

2) Préparation de suspensions de spores en milieu liquide

Des boites de pétri colonisées par l'un des deux champignons sont grattées à l'aide d'un scalpel stérile avec 3 mL de milieu pour mettre les spores en suspension. La suspension obtenue est alors filtrée avec un entonnoir recouvert d'une étamine stérile. Une cellule de comptage de Fuchs-Rosenthal est utilisée pour estimer sa concentration en spores. La concentration obtenue est alors ajustée pour obtenir la concentration voulue.

3) Evaluation du relargage des ions potassium (K^+) dans le milieu extracellulaire

Pour les deux champignons étudiés, des suspensions de spores de 5mL à 10^5 spores/mL sont réalisées dans du milieu PDB (Potato Dextrose Broth, 24g de PDB par litre d'eau distillée) autoclavé 20min à 120°C. Le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate sont ensuite ajoutés pour obtenir les concentrations finales suivantes : 100µM, 500µM, 1000µM. Une suspension de spores non traitée sert de témoin. Un kit de bandelettes colorées QUANTOFIX® (Macherey-Nagel) est utilisé pour mesurer le relargage des ions K^+. Les bandelettes sont utilisées selon le protocole fourni par le fabricant (Annexe I). Pour chaque champignon, les mesures sont réalisées toutes les heures pendant 5h.

4) Evaluation du fonctionnement des pompes à protons (H^+) par la mesure de l'acidification du milieu induite par le glucose

Le protocole est adapté de celui décrit par Tian *et al.*, 2012. Des suspensions de 25 mL de spores de *F. culmorum* et *C. sativus* à 10^5 spores/mL sont préparées dans du milieu YECSB (Yeast Extract Corn Starch Broth) autoclavé 20min à 120°C. La composition de ce milieu est identique au milieu YECSA mais ne contient pas d'agar. Ces suspensions sont placées dans des erlenmeyers de 100mL et mises en agitation à 100rpm pendant 48h à 72h à 22±1°C et sous une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit, afin d'obtenir 1g de mycélium.

Le mycélium est ensuite filtré et rincé à l'eau distillée stérile puis re-suspendu dans 40mL de KCl à 50mM. Le tout est placé pour 18 heures à 4°C sous agitation à 100rpm et à l'obscurité. L'objectif de cette étape est de placer le mycélium dans des conditions stressantes.

Le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate sont ensuite ajoutés pour obtenir les concentrations suivantes : 100µM, 500µM, 1000µM, 2000µM. Un mycélium non traité est utilisé comme témoin. Les suspensions sont alors placées à 20±1°C sous agitation à 100rpm pendant 3h pour *F. culmorum* et 4h pour *C. sativus.*

Ces durées d'incubation des champignons en présence des molécules ont été déterminées à partir des résultats obtenus lors de l'évaluation du relargage des ions K^+ (cf III-1).

Le mycélium est ensuite récupéré par filtration et re-suspendu dans 20mL d'une solution de glucose à 10% (pH 7) dans le but de stimuler le fonctionnement des pompes à protons. Des mesures de pH sont alors réalisées toutes les 10min pendant 1h à l'aide d'un pH-mètre (Inolab WTW). Trois répétitions indépendantes ont été réalisées pour chaque champignon. La concentration en H^+ relâchés dans le milieu extracellulaire est calculée par la différence entre le pH initial (T=0min) et le pH final (T=60min). La valeur obtenue est appliquée à l'équation suivante : $pH = -\log[H+]$. Le pourcentage d'acidification pour chaque traitement est alors calculé en admettant que la valeur obtenue avec le témoin correspond à 100% d'acidification (Diz *et al.*, 2006).

5) Evaluation du pH intracellulaire des spores

Pour chaque champignon, une suspension de spores à 10^6 spores/mL est réalisée dans du PDB. Les deux molécules sont ensuite ajoutées à la suspension, à des concentrations de



Figure 7 : Zone de virage de couleur du vert de malachite en fonction du pH

Tableau 1 : Résumé des modalités testées en cytométrie de flux et en microscopie à fluorescence. C : Cytométrie de flux, MF : Microscopie à fluorescence

Modalités	Description	Coloration au PI	Temps d'incubation	Techniques utilisée
Témoin négatif	Spores non traitées par les 2 esters	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
Témoin positif	Spores traitées par la chaleur (bain marie : 90°C pendant 10min)	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
Auto-fluorescence	Spores non colorées à l'iodure de propidium et non traitées par les 2 esters	Non	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
MA100	Méthyl Acrylate 100µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF
MA500	Méthyl Acrylate 500µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF
MA1000	Méthyl Acrylate 1000µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF
MA2000	Méthyl Acrylate 2000µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF
MP100	Méthyl Propionate 100µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF
MP500	Méthyl Propionate 500µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF
MP1000	Méthyl Propionate 1000µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF
MP2000	Méthyl Propionate 2000µM	Oui	*F. culmorum* : 3h	C+MF
			C. sativus : 4h	MF
			Les deux : 5h	MF

100, 500 et 1000µM. Les suspensions sont alors placées à 20±1°C sous agitation à 100rpm pendant 3h pour *F. culmorum* et 4h pour *C. sativus*. Dans des tubes eppendorf, 50µL de chaque suspension sont ensuite mélangés à 50µL de solution de vert de malachite à 0.02% (indicateur coloré (Figure 7)). Après 10min, des comptages au microscope optique (Zeiss Primo Star) sont réalisés. Les spores vertes et les spores jaunes sont dénombrées sur 100 spores. Quatre répétitions indépendantes ont été réalisées pour *F. culmorum*. Une répétition a été réalisée pour *C. sativus*.

6) Evaluation de l'intégrité membranaire en cytométrie de flux et microscopie à fluorescence

Dans le but de quantifier d'éventuelles perturbations de la membrane, des expériences de cytométrie ont été réalisées. Pour cela de l'iodure de propidium (PI) a été utilisé. Cette molécule est un bon indicateur de déstabilisation des membranes. En effet, elle n'est capable de traverser la membrane que lorsque cette dernière est perméabilisée. De plus, elle émet une fluorescence rouge quand la molécule se lie à l'ADN et donc lorsqu'elle entre dans la cellule.

Des suspensions de spores de *F. culmorum* à 10^6 spores/mL ont été réalisées dans une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) à pH 7.4. Cette solution contient : 4g de NaCl, 0.1g de KH_2PO_4, 0.1g de KCl, 0.72g de NA_2HPO_4 pour 500ml de solution. Les suspensions ont ensuite été traitées avec le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate afin d'obtenir des concentrations de 100, 500 et 1000µM. Une suspension non traitée est utilisée comme témoin négatif. Après 3h d'incubation à 20±1°C sous agitation à 100rpm, le PI est ajouté à chaque suspension pour obtenir une concentration de 1µg/mL. Les suspensions de spores sont alors incubées 30min avec le PI à 20±1°C (Tian *et al.*, 2012). Une suspension de spores non traitées par les molécules et non colorée au PI permet de contrôler l'auto-fluorescence des spores. Enfin, une suspension traitée par la chaleur afin de tuer les spores (10min, 90°C) et colorée au PI sert de témoin positif. Un résumé des modalités testées se trouve dans le Tableau 1. Les mesures sont réalisées avec un cytomètre (BD ACCURI C6 Flow cytometer). Cette expérience n'a pas été réalisée sur *C. sativus*.

En parallèle, des observations en microscopie à fluorescence des deux champignons colorés au PI sont réalisées pour faciliter l'interprétation des résultats obtenus en cytométrie de flux. Les observations sont faites à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss Axioskop 2 MOT) équipé d'une lampe HBO 100W ainsi que d'une caméra et de son logiciel

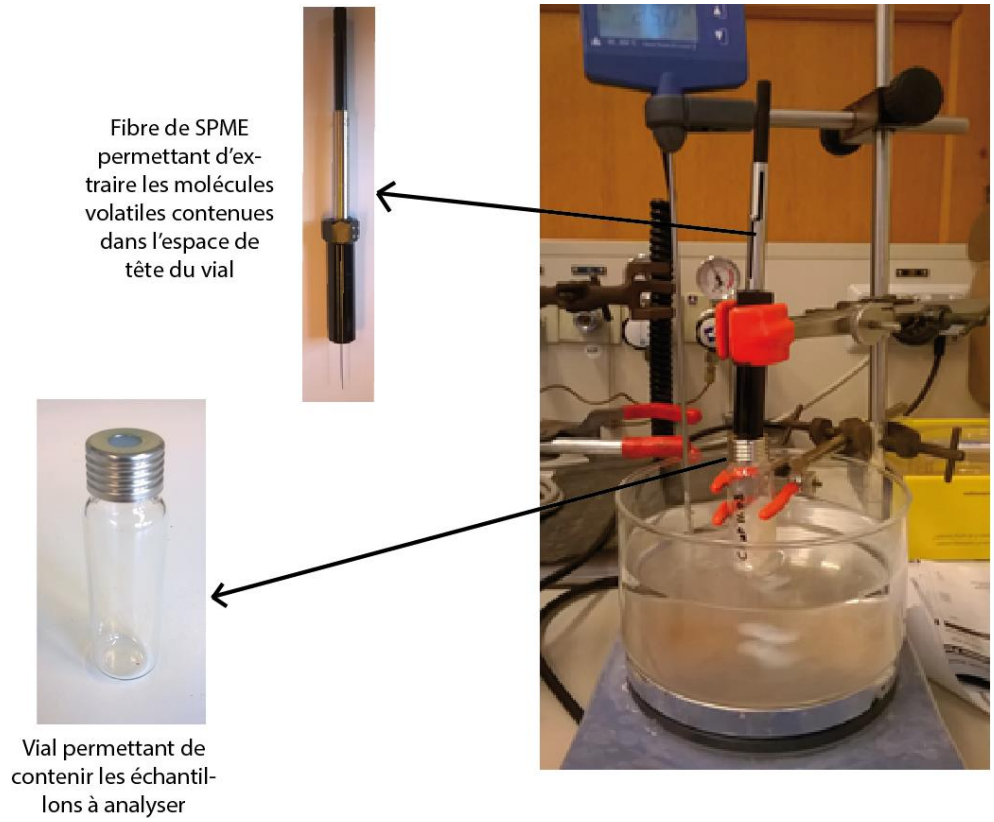


Figure 8 : Extraction des molécules par Solid Phase Micro Extraction (SPME). L'échantillon à analyser est contenu dans un vial propre et hermétique. La température du vial est équilibrée à 25°C pendant 10min. Une fibre de SPME est ensuite insérée dans le vial pour prélever les molécules volatiles présentes dans l'espace de tête du vial. Ce prélèvement est réalisé pendant 20min à 25°C.

correspondant (AxioVision). Un filtre d'excitation bleu est utilisé pour visualiser la coloration au PI et l'auto-fluorescence des spores. La préparation des échantillons est identique à celle des échantillons réalisés en cytométrie. Cependant, après incubation des suspensions avec le PI pendant 30min, les échantillons sont centrifugés à 8000tr/min pendant 5min et re-suspendus dans une solution de PBS. Les observations sont faites sur l'ensemble des modalités présentées dans le Tableau 1. Deux modalités ont été testées en plus : Méthyl Acrylate et Méthyl Propionate à 2000µM. De plus, deux temps d'incubation ont été testés : 3h et 5h pour *F. culmorum,* 4h et 5h pour *C. sativus.*

7) Prélèvement de molécules volatiles par Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) et analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)

Afin de déterminer l'origine fongique ou végétale des deux esters, l'émission du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate a été étudiée par SPME (Figure 8) et GC-MS. La SPME est une technique permettant de prélever de façon statique des molécules volatiles présentes dans l'espace de tête d'un liquide ou d'un gaz à l'aide d'une fibre recouverte d'adsorbant.

L'objectif de cette expérience est de créer des conditions favorables à l'émission des deux molécules en ayant dans chaque modalité uniquement la présence du champignon vivant ou uniquement la présence de la plante vivante.

- Pour déterminer si les racines de l'orge pourraient émettre les composés étudiés, ces racines ont été mises en contact avec le pathogène mort. Des racines d'orge ont donc été inoculées avec une suspension de spores à 10^6 spores/mL de *C. sativus* tuées par la chaleur dans le but de voir si la plante émet les molécules. Pour cela, des caryopses d'orge sont stérilisés selon un protocole adapté de Lanoue et al (2010). 100 caryopses sont incubés pendant 1h dans une solution de H_2SO_4 (10%v/v). Après 5 lavages à l'eau distillée, les caryopses sont incubés 20min dans $AgNO_3$ (1% poids/volume) en agitation à 120rpm. Puis, un rinçage avec une solution de NaCl (1% poids/volume) est réalisé suivi d'un rinçage à l'eau distillée, à nouveau suivi par un rinçage avec une solution de NaCl (1% poids/volume). Enfin, 5 rinçages à l'eau distillée sont réalisés. Les caryopses sont placés par 10 dans des boites de pétri carrées de 12cm de côté contenant 50mL de milieu Hoagland (1.6g d'Hoagland pour 1L d'eau distillée). Après 48h de pré-germination à 22±1°C et sous une photopériode de 16h de

jour et 8h de nuit, les caryopses sont inoculés avec 1mL de suspension de spores de *C. sativus* à 10^6 spores/mL traitée à la chaleur pendant 10min à 90°C pour tuer les spores. Sept jours après inoculation, les racines de 10 caryopses sont récoltées en coupant juste sous le caryopse et placées dans un vial pour procéder à l'extraction et à l'analyse des molécules volatiles présentes dans l'espace de tête de le vial.

- Pour déterminer si le champignon pourrait émettre les molécules étudiées, *C. sativus* a été cultivé dans des conditions décrites dans la littérature comme propices à l'émission de molécules antifongiques. Ces conditions sont les suivantes :

- Surpopulation. *C. sativus* a été cultivé en forte concentration (10^9 spores/mL) dans des vials contenant chacun 7mL de milieu. Deux milieux de culture ont été utilisés : PDA (solide) et PDB (liquide). Différentes durées de culture ont été testées : 12 jours et 18 jours pour les cultures en milieu PDA et 24h, 48h, 12 jours et 17 jours pour les cultures en milieu PDB. Les cultures sont placées à 22±1°C et sous une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit. Les cultures en milieu liquide sont agitées à 100rpm.

- Conditions défavorables à la croissance du champignon. *C. sativus* a été cultivé en conditions limitantes en nutriments. 40µL de suspension de spores de *C. sativus* à 10^7 spores/mL ont été utilisés pour inoculer 7mL d'eau gélosée (1% d'agar) présent dans des vials. Les vials sont ensuite placés à 22±1°C et sous une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit pendant 12 et 18 jours.

- Compétition. *C. sativus* a été cultivé en présence de *F. culmorum.* Pour cela, 20µL de suspension de spores de *C. sativus* à 10^7spores/mL mélangés à 20µL de suspension de spores de *F. culmorum* à 10^7spores/mL sont utilisés pour inoculer 7mL de milieu de culture contenu dans des vials. Le milieu liquide PDB ainsi que le milieu solide PDA sont testés. La culture en milieu PDA a été analysée après 7 jours, les cultures en milieu PDB ont été analysées après 13 et 17 jours. Les cultures sont placées à 22±1°C et sous une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit. Les cultures en milieu liquide sont agitées à 100rpm.

Différents témoins sont réalisés lors de chaque analyse : blanc colonne, blanc fibres, milieux de cultures (eau gélosée, PDA, PDB), racines d'orge saines, vials stériles afin de déterminer la provenance de l'ensemble des molécules extraites.

Préalablement à leur utilisation, les vials ont été désinfectés dans du RBS (détergent 2% v/v dans de l'eau) pendant 15min. Trois rinçages à l'eau distillée sont ensuite effectués suivis

d'un rinçage à l'éthanol. Tous les prélèvements sont réalisés à l'aide de fibres de silice constituée de trois phases stationnaires : divinylbenzene - carboxen - polydimethylsiloxane (DVB – Carboxen – PDMS). Les vials sont équilibrés pendant 10 minutes à 25°C. La fibre est ensuite insérée dans le vial puis exposée et le prélèvement de volatils est réalisé pendant 20min à 25°C (Figure 8). Les molécules prélevées par la fibre sont ensuite désorbées thermiquement dans un chromatographe en phase gazeuse (Agilent Technologies 7890A) et séparées sur une colonne polaire VF-WAX (Agilent technologies). Les molécules sont alors analysées par un spectromètre de masse (Agilent Technologies 5975 C). Le logiciel Chemstation version E.02.00.493 est utilisé pour l'analyse des chromatogrammes. Un composé n'est considéré que lorsqu'il est absent des blancs, et identifié avec une probabilité de plus de 90% avec les trois bases de données : Wiley 275, NBS 75K, Pal 600K.

8) Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques est réalisé à l'aide du logiciel R version 3.1.3 (R Core Team, 2015). A la suite d'une ANOVA à un facteur, le test de comparaisons multiples de Dunnett ($p<0.005$) est utilisé afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes obtenues lors des traitements et les moyennes du témoin.

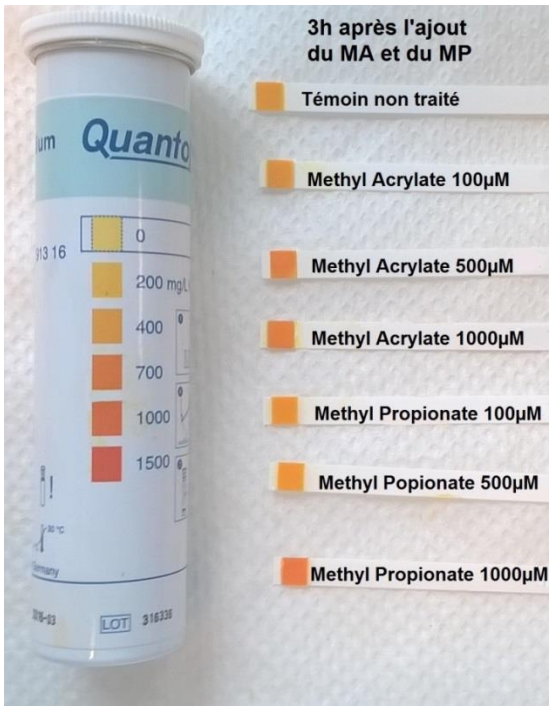


Figure 9 : Evaluation de la quantité d'ions K^+ (en mg/L) présents dans le milieu extracellulaire de spores de *F. culmorum* soumis à différentes concentrations en Méthyl Acrylate et Méthyl Propionate à l'aide d'un kit colorimétrique QUANTOFIX® (Macherey-Nagel)

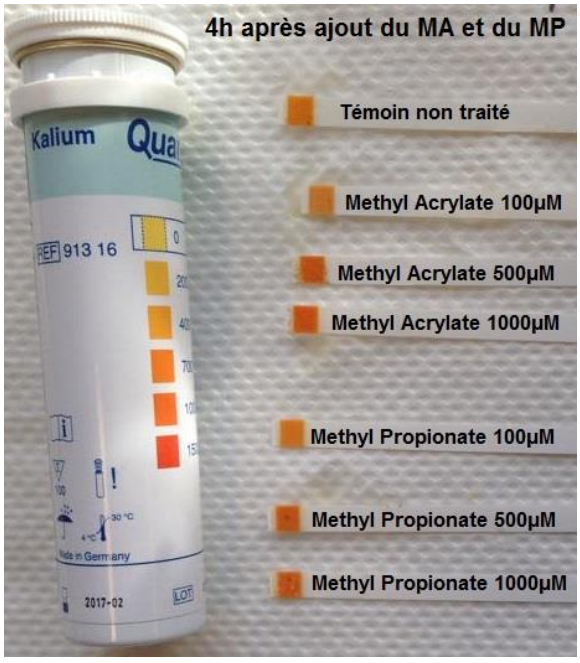


Figure 10 : Evaluation de la quantité d'ions K^+ (en mg/L) présents dans le milieu extracellulaire de spores de *C. sativus* soumis à différentes concentrations en Méthyl Acrylate et Méthyl Propionate à l'aide d'un kit colorimétrique QUANTOFIX® (Macherey-Nagel)

III- Résultats

1) Relargage des ions K^+ dans le milieu extracellulaire

L'expérience réalisée semble montrer un effet dose-dépendant du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate sur le relargage des ions K^+ dans le milieu extracellulaire des spores de *F. culmorum* et *C. sativus*.

Pour *F. culmorum*, un effet du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate est visible après 3h d'incubation des spores avec les molécules (Figure 9). Une augmentation de la quantité d'ions K^+ est observée pour des concentrations en Méthyl Acrylate de 500µM et 1000µM et pour des concentrations en Méthyl Propionate de 1000µM. Pour un même temps d'incubation, l'action du Méthyl Acrylate sur le relargage des ions K^+ semble donc se produire à des concentrations plus faibles que celles du Méthyl Propionate. Après 5h d'incubation, le relargage des ions K^+ par le Méthyl Acrylate à 1000µM semble s'intensifier et le Méthyl Propionate à 500µM semble lui aussi avoir un effet.

Pour *C. sativus*, une augmentation de l'efflux d'ions K^+ est visible après 4h d'incubation avec le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate (Figure 10). Cette augmentation se produit pour des concentrations en Méthyl Acrylate et en Méthyl Propionate de 500µM et 1000µM. L'augmentation des ions K^+ semble plus intense pour les traitements au Méthyl Acrylate qu'au Méthyl Propionate. Tout comme pour *F. culmorum*, après 5h d'incubation, le relargage des ions K^+ par le Méthyl Propionate à 500µM et 1000µM semble s'intensifier. De plus, le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate à 100µM montrent également un effet sur l'augmentation de l'efflux des ions K^+ dans le milieu extracellulaire.

Ces résultats semblent donc montrer que le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate agissent après 3h d'incubation pour *F. culmorum* et 4h pour *C. sativus*. De plus, le Méthyl Acrylate semble avoir plus d'effet que le Méthyl Propionate sur le relargage des ions K^+ (action plus importante à plus faible concentration). Enfin, de manière générale, l'action des molécules sur le relargage des ions K^+ semble plus importante sur *C. sativus* que sur *F. culmorum* en terme de quantité d'ions relâchés.

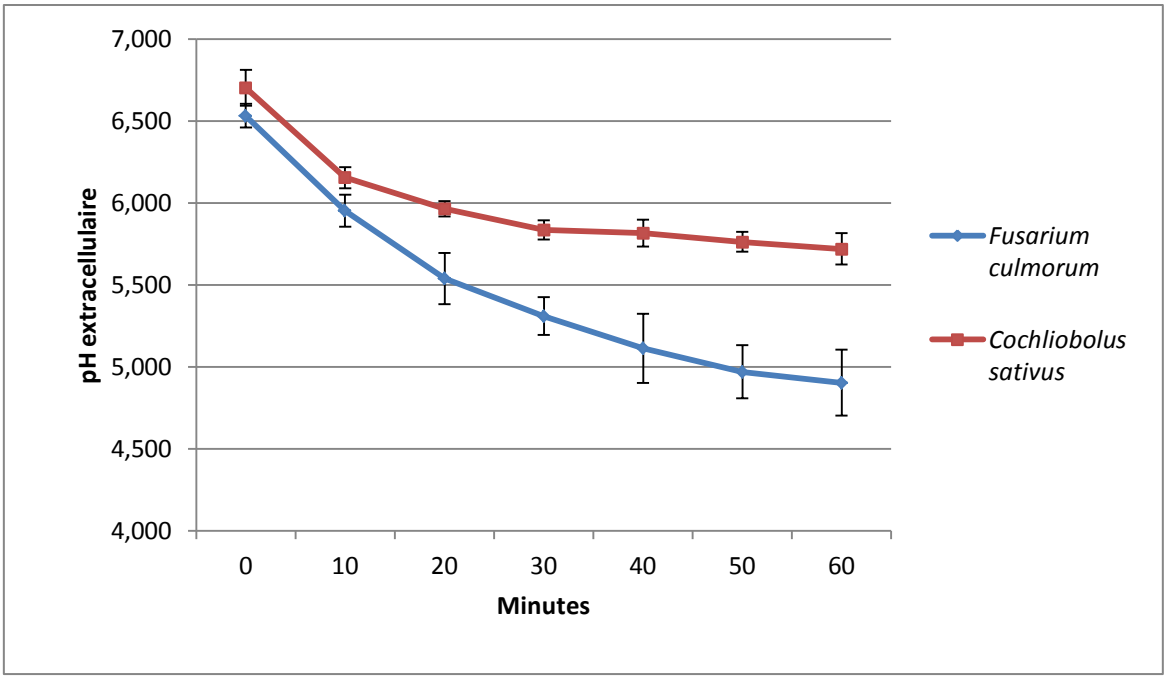


Figure 11 : Evolution du pH extracellulaire de *F. culmorum* et *C. sativus* en absence de traitement (témoin). Le temps t=0minute correspond au moment où le mycélium est re-suspendu dans une solution de glucose à 10% et pH7.

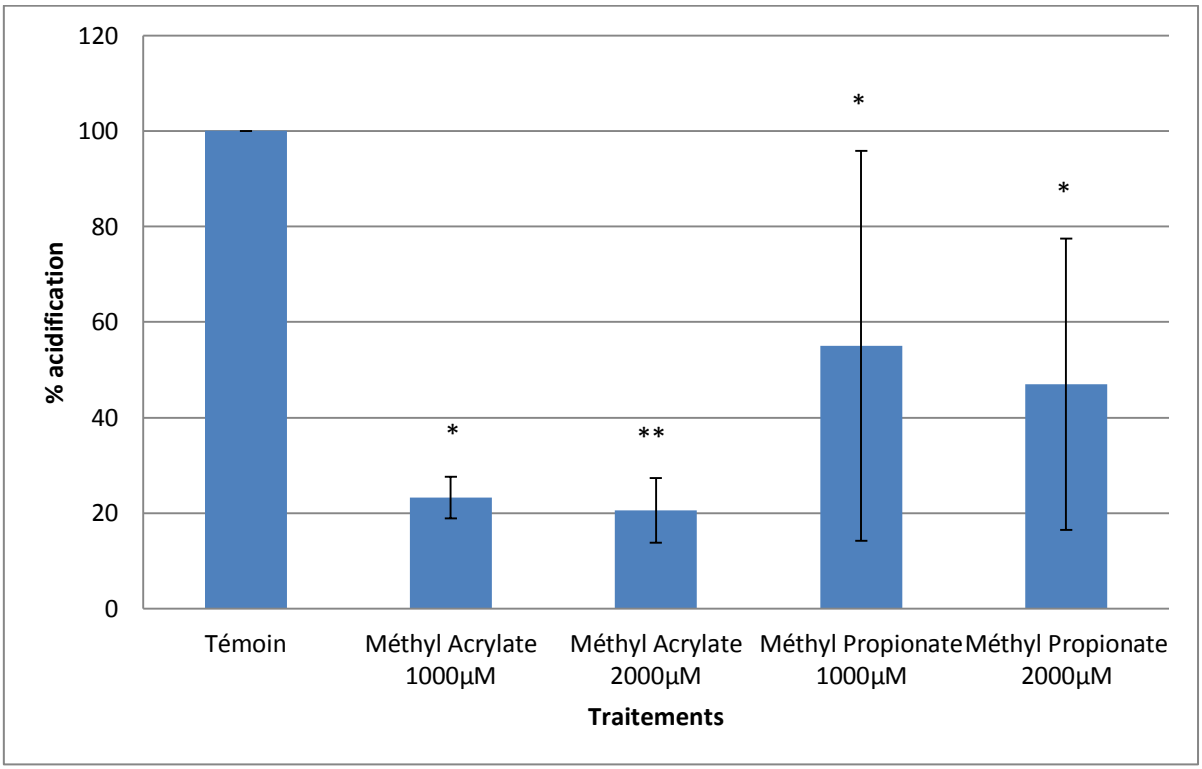


Figure 12 : Acidification du milieu induite par le glucose après 3h d'incubation du mycélium de *F. culmorum* en présence du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate

2) Fonctionnement des pompes à protons (acidification du milieu induite par le glucose)

L'activité des pompes à protons de *F. culmorum* et *C. sativus* est suivie par la mesure de l'acidification du milieu induite par le glucose. Le fonctionnement normal de ces pompes entraine en effet le transport de protons vers le milieu extracellulaire et donc une acidification du milieu (Figure 11).

Les traitements du mycélium de *F. culmorum* au Méthyl Acrylate et au Méthyl Propionate à 1000µM et 2000µM provoquent une inhibition significative de l'acidification du milieu par rapport au témoin (Figure 12). Les deux molécules semblent donc provoquer une inhibition des pompes à protons des spores de *F. culmorum*. L'inhibition provoquée par les traitements au Methyl Acrylate semble plus importante. De plus, l'effet du Méthyl Propionate est plus variable que le Méthyl Acrylate. Aucune différence significative n'est observée entre les traitements à 1000 et 2000µM pour chacune des deux molécules (p-valeur=1). Il ne semble donc pas y avoir d'effet dose.

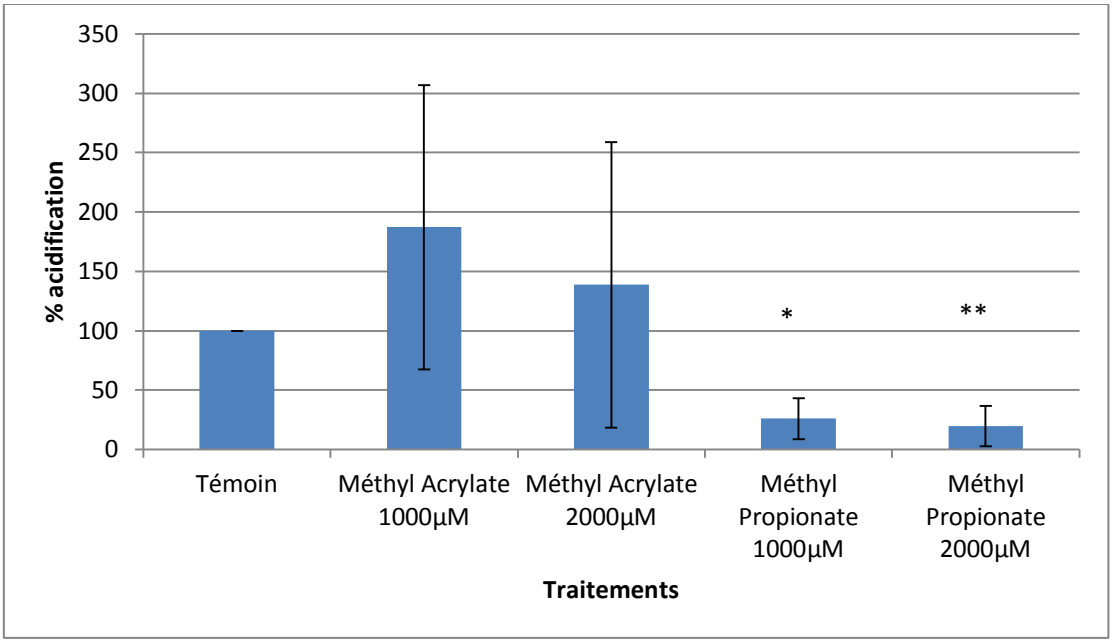


Figure 13 : Acidification du milieu induite par le glucose après 4h d'incubation du mycélium de *C. sativus* en présence du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate

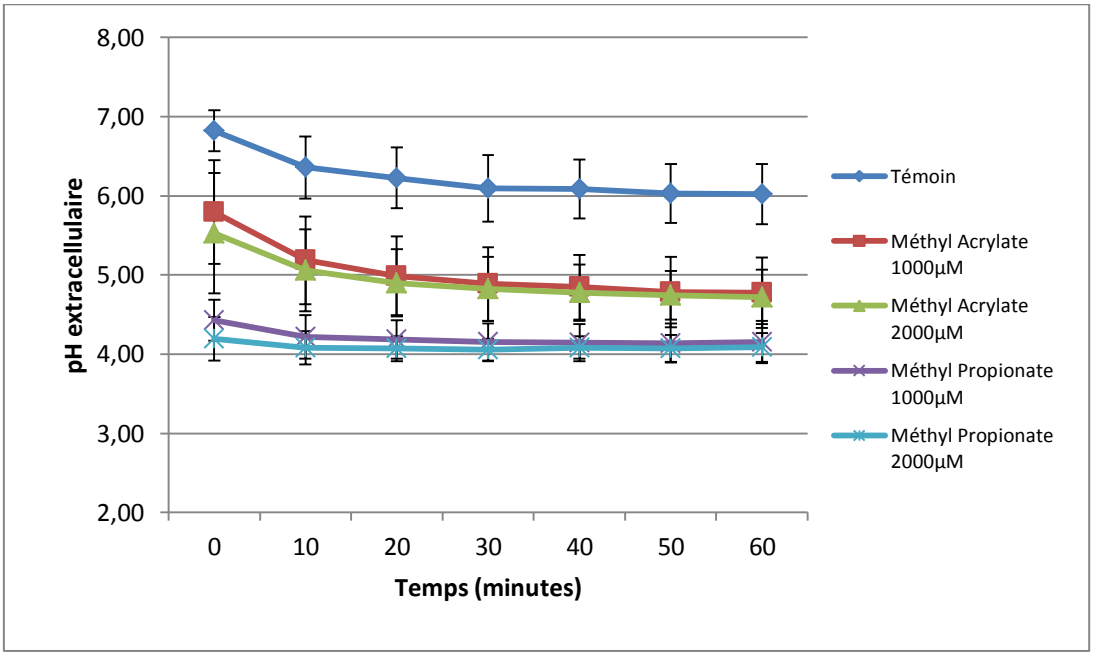


Figure 14 : Evolution du pH extracellulaire de *C. sativus* après 4h d'incubation en présence du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate. Le temps t=0minute correspond au moment où le mycélium est re-suspendu dans une solution de glucose à 10% et pH7.

Concernant *C. sativus*, seuls les traitements du mycélium au Méthyl Propionate à 1000µM et 2000µM provoquent une inhibition significative de l'acidification du milieu induite par le glucose par rapport au témoin (Figure 13). Il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements au Méthyl Propionate (p-valeur=1). Nous avons cependant observé que le pH mesuré au temps t=0 (juste après la re-suspension du mycélium dans la solution de glucose) était plus faible lors des traitements avec les molécules par rapport au témoin (Figure 14). Ainsi, le pH au temps t=0 du témoin est en moyenne de 6.8±0.18 alors que le pH à t=0 du Méthyl Propionate à 2000µM est de 4.2±0.23. Une acidification du milieu semble donc avoir lieu dans les suspensions de mycéliums de *C. sativus* traités avec les molécules, juste après la remise en suspension dans le glucose. Puis, après 10min de mesure, le pH se stabilise. L'acidification observée est plus forte avec le Méthyl Propionate qu'avec le Méthyl Acrylate.

Les pourcentages d'acidification du milieu provoquée par les traitements du mycélium de *C. sativus* au Méthyl Acrylate sont très variables. Il est donc difficile de conclure sur l'effet de cette molécule sur les pompes à protons de *C. sativus*.

Il semble donc que le Méthyl Acrylate inhibe l'acidification du milieu de *F. culmorum* alors que le Méthyl Propionate montre un effet inhibiteur sur *C. sativus*. De plus, l'augmentation de la concentration des molécules à 2000µM ne semble pas augmenter l'inhibition de l'acidification.

Des concentrations plus basses ont également été testées (100µM et 500µM) mais n'ont montré aucun effet sur l'acidification du milieu dépendante du glucose.

	Pourcentage de conidies colorées en jaune par le vert de malachite
Témoin non traité	0
Méthyl Acrylate 100µM	0
Méthyl Acrylate 500µM	13.2 % ± 4.8 (*)
Méthyl Acrylate 1000µM	35.6 % ± 9.6 (***)
Méthyl Propionate 100µM	0
Méthyl Propionate 500µM	0
Méthyl Propionate 1000µM	0

Tableau 2 : Pourcentage de conidies de *F. culmorum* dont le pH a diminué (coloration jaune au vert de malachite) après 3h d'incubation avec les molécules en différentes concentrations

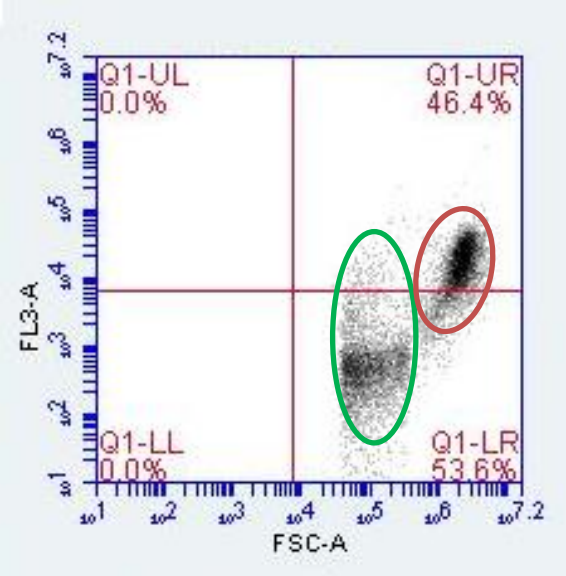


Figure 15 : Analyse en cytométrie de flux des spores de *F. culmorum* non traitées par le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate et en absence d'iodure de propidium. FSC.A : diffusion axiale indiquent la taille des évènements, FL3.A : Fluorescence rouge. Les deux cercles correspondent à deux ensembles d'évènements distincts par leur taille (FSC.A). Les évènements présents dans le cercle rouge émettent une fluorescence.

3) Modification du pH intracellulaire des spores

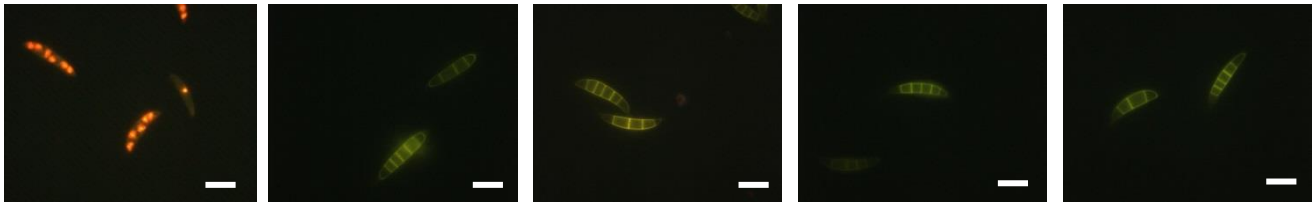
Une modification significative de la coloration des spores au vert de malachite par rapport au témoin est observée pour des concentrations en Méthyl Acrylate de 1000µM et 2000µM (Tableau 2). La modification de la coloration ne se produit cependant pas pour la totalité des spores analysées. Ainsi, seulement 35,6% des spores montrent une modification de coloration par le Méthyl Acrylate à 1000µM. Concernant, le Méthyl Propionate, le pH intracellulaire des spores ne semble pas être modifié sous l'action de cette molécule.

Cette expérience n'a pas pu aboutir avec *C. sativus* dont les spores se colorent difficilement au vert de malachite.

4) Maintien de l'intégrité membranaire des spores

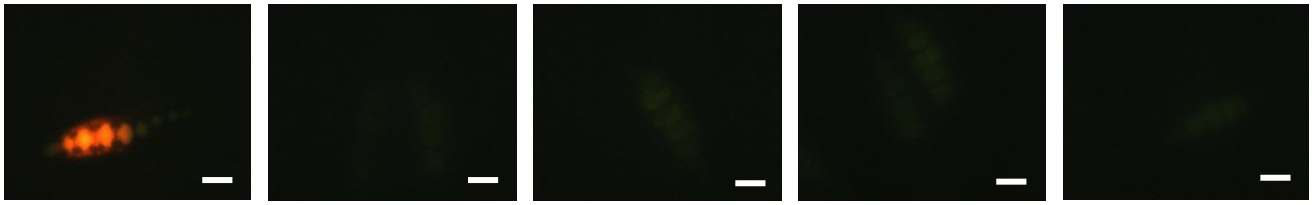
- Cytométrie de flux

L'expérience de cytométrie réalisée sur les spores de *F. culmorum* laisse penser que les spores de ce champignon sont fortement auto-fluorescentes. En effet, la Figure 15 présente les résultats obtenus en absence de PI. Pourtant, une fluorescence est obervée (parmètre FL3.A) sur une partie des évènements (cercle rouge).. De plus, la Figure 15 met en évidence deux nuages de points distincts (cercle rouge et vert). Ces deux nuages correspondent à deux catégories d'évènements qui diffèrent par leur taille (paramètre FSC.A). Les deux types d'évenements pourraient correspondre à deux types de spores de tailles différentes mais aussi à la recristallisation de la solution de PBS. Des observations au microscope à fluorescence ont été réalisées pour répondre à ces intérrogations. L'expérience n'a donc pas été répétée.



A B C D E

Figure 16 : Observations au microscope à fluorescence des spores de *F. culmorum* soumis à différents traitements. A : Témoin positif (Spores traitées à la chaleur : 90°C pendant 10min et colorées au PI), B : Auto-fluorescence (Spores non colorées au PI, non traitées par le Méthyl Acrylate et Méthyl Propionate), C : Témoin négatif (Spores colorées au PI, non traitées par le Méthyl Acrylate et Méthyl Propionate), D : Spores traitées au Méthyl Acrylate à 1000µM pendant 3h et colorées au PI, E : Spores traitées au Méthyl Propionate à 1000µM pendant 3h et colorées au PI. Echelle : 20µm.



A B C D E

Figure 17 : Observations au microscope à fluorescence des spores de *C. sativus* soumis à différents traitements. A : Témoin positif (Spores traitées à la chaleur : bain marie 90°C pendant 10min et colorées au PI), B : Auto-fluorescence (Spores non colorées au PI, non traitées par le Méthyl Acrylate et Méthyl Propionate), C : Témoin négatif (Spores colorées au PI, non traitées par le Méthyl Acrylate et Méthyl Propionate), D : Spores traitées au Méthyl Acrylate à 1000µM pendant 4h et colorées au PI, E : Spores traitées au Méthyl Propionate à 1000µM pendant 4h et colorées au PI. Echelle : 20µm.

- Microscope à fluorescence

Les observations au microscope à fluorescence des spores de *F. culmorum* non colorées au PI et non traitées par les molécules confirment la forte auto-fluorescence des spores (Figure 16). De plus, les spores inactivées par la chaleur et colorées au PI présentent une coloration rouge de l'intérieur des spores alors que l'observation des spores traitées par le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate ne montre aucune coloration quelque soit la concentration et le temps d'incubation (Figure 16).

Lors des premières observations, des cristaux de PBS colorés en rouge ont été observés. Pour les observations suivantes, les échantillons ont été centrifugés à 8000 tr/min pendant 5min après coloration au PI puis resuspendus dans du PBS.

Les observations au microscope à fluorescence des spores de *C. sativus* non colorées au PI et non traitées par les molécules montrent que les spores de ce champignons sont très peu auto-fluorescentes (Figure 17). Les résultats obtenus avec *C. sativus* sont similaires aux résultats de *F. culmorum*. Les spores tuées à la chaleur montrent une coloration rouge due au PI alors que les spores traitées avec les molécules en différentes concentrations et après différents temps d'incubation ne sont pas colorées. Le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate ne semblent donc pas d'altérer l'intégrité membranaire des spores de *F. culmorum* et *C. sativus*.

Tableau 3 : VOCs émis par *C. sativus* et par la plante dans les différentes situations étudiées. CAS (Chemical Abstract Service). Seules, les molécules ayant un indice de qualité supérieure à 90% sont présentées dans ce tableau. Les molécules sont classées dans l'ordre croissant de leur temps de rétention. (Suite du tableau : page suivante)

Composés	CAS	MODALITES													
		Interaction orge - *C. sativus*			*C. sativus* en surpopulation						Conditions défavorables à la croissance de *C. sativus*		Compétition avec *F. culmorum*		
		Racines d'orge inoculées avec *C. sativus* tué	Racines d'orge inoculées avec *C. sativus* vivant	Racines d'orge saines	PDA 12jours	PDA 18jours	PDB 24h	PDB 48h	PDB 13jours	PDB 17jours	Gélose 12jours	Gélose 18jours	PDA 7jours	PDB 13jours	PDB 17jours
Hexane	75-18-3		X												
Dimethyl sulfide	75-18-3	X	X	X											
Acetone	67-67-1									X					
Ethyl acetate	141-78-6				X								X		
butan-2-one	78-93-3	X				X	X	X							
2,6-dimethylheptadecane	54105-67-8	X													
2-methyldecane	6975-98-0	X													
Propanol	71-23-8												X	X	
3,7-dimethyldecane	17312-54-8	X													
2-methylpropan-1-ol	78-83-1				X		X		X				X	X	X
butan-2-ol	78-92-2					X									
tetracosan-1-ol	506-51-4							X							
3-methylbutan-1-ol	123-51-3				X	X	X	X	X	X			X	X	X
1,2,4-trimethylbenzene	95-63-6												X		
4-methyl hex-4-en-3-one	52883-78-0									X					
3-hydroxy butan-2-one	513-86-0				X	X			X	X					
1,3-Bis (1,1-dimethylethyl) benzene	1014-60-4										X				
Acide ethanoïque	64-19-7													X	X
2-ethyl hexan-1-ol	104-76-7	X		X											
Cyclosativene	22469-52-9						X								
Ylangene	14912-44-8							X	X						
(+)-cycloisosativene	0000-00-00												X		
Pentadecane	629-62-9										X	X			
(+)-sativene	3650-28-0	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

5) Prélèvement de molécules volatiles par Micro-Extraction sur Phase Solide (SPME) et analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)

Le Tableau 3 regroupe l'ensemble des molécules détectées dans les différents tests. Le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate n'ont pas été détectés dans les vials contenant les racines d'orge inoculées avec des spores de *C. sativus* tuées (Tableau 3). Les deux molécules ne semblent pas non plus être présentes dans les vials contenant *C. sativus* en surpopulation, en compétition avec *F. culmorum* et en conditions défavorables et ceci quel que soit le milieu et le temps de culture. Cependant, comme dans l'étude de Fiers *et al.*, des racines d'orge inoculées avec des spores de *C. sativus* vivantes ont aussi été testées. Mais, ni le Méthyl Acrylate ni le Méthyl Propionate n'ont été détectés dans cette modalité. Ces résultats ne permettent donc pas de conclure quant à l'origine des deux molécules.

Le tableau montre aussi des différences d'émission de molécules volatiles selon le milieu et le temps de culture. Ainsi, après 48h de culture en milieu solide de *C. sativus*, 12 molécules sont détectées alors que 24h auparavant 9 molécules étaient détectées. De plus, ces molécules diffèrent : seules 4 molécules sont communes à ces deux modalités.

Les cultures sur eau gélosée montrent un nombre moins important de molécules émises. Ceci est probablement dû aux conditions défavorables à la croissance de champignon et donc à une population plus réduite. De plus, certaines molécules volatiles sont communes à toutes les modalités contenant *C. sativus*. C'est le cas du (+)-sativène mais aussi du longifolène qui semblent être caractéristiques de ce champignon (Fiers *et al.*, 2013). Le (+)-sativène est aussi détecté lorsque les racines sont inoculées avec *C. sativus* mort. Des molécules émises par le champignon sont donc détectables malgré l'inactivation de ce dernier.

De nombreux COVs présents dans le Tableau 3 sont référencés dans la base de données mVOC (Lemfack *et al.*, 2014). Par exemple, le dimethyl sulfide est un COV émis par la bactérie *Burkholderia ambifaria*. Cette molécule inhibe la croissance de *Rhizoctonia solani* et *Alternaria alternata* et provoque une augmentation de la biomasse d'*Arabidopsis thaliana* (Groenhagen *et al.*, 2013).

Tableau 3 (suite) : VOCs émis par *C. sativus* et par la plante dans les différentes situations étudiées. CAS (Chemical Abstract Service). Seules, les molécules ayant un indice de qualité supérieure à 90% sont présentées dans ce tableau. Les molécules sont classées dans l'ordre croissant de leur temps de rétention.

Calamenene	483-77-2									X					
(+)-aromadendrene	489-39-4							X		X					
Germacrene A	28387-44-2							X	X	X			X		
Longifolene	475-20-7		X		X	X	X	X	X	X			X		
Alpha-duprezianene	0000-00-00								X						
Epi-bicyclosesquiphellandrene	54324-03-7												X	X	X
(-)-lepidozene	79951-53-4												X		
Gamma-curcumene	0000-00-00								X						
Di-epi-alpha-cedren	35944-22-0						X								
(-)-Beta-acoradiene	90457-37-7								X				X		
Alpha-amorphene	23515-88-0												X		
Trans-alpha-bisabolene	17627-44-0						X		X				X		
Helminthogermacrene	75023-40-4						X		X						
6-methyl-gamma-ionone	27417-37-4			X											
Phenethyl alcool	60-12-8				X	X							X		X
Ethyl phthalate	84-66-2	X													
Total		8	4	3	7	7	9	12	12	11	3	3	15	6	6

IV- Discussion

Mode d'action du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate

L'augmentation de l'efflux de K^+ sous l'effet de molécules antimicrobiennes est un phénomène souvent observé. Par exemple, l'huile essentielle d'origan perturbe la perméabilité membranaire de *Pseudomonas aeruginosas* et de *Staphylococcus aureus* ce qui entraine une augmentation de l'efflux d'ions K^+ dans le milieu (Lambert *et al.*, 2001). De même, l'huile essentielle de *Melaleuca* inhibe la croissance d'*Escherichia coli* en stimulant la fuite d'ions K^+ vers le milieu extracellulaire (Cox *et al.*, 1998). Les flux d'ions à travers la membrane sont courants et permettent de réguler de nombreux processus biologiques. Une perturbation de l'équilibre des ions tels que le K^+ peut ainsi affecter le contrôle de la pression de turgescence, le transport de solutés, la synthèse de protéines. (Cox *et al.*, 2001; Rodriguez-Navarro, 2000). Il est possible que la croissance mycélienne mais aussi la germination des spores de *F. culmorum* et *C. sativus* soient altérées par cette modification des flux d'ions K^+. Une augmentation de l'efflux de K^+ à travers la membrane est généralement liée à une augmentation de la perméabilité membranaire (Sikkema *et al.*, 1995). Cependant, dans notre modèle, cette déstabilisation n'a pas été suffisante pour permettre l'entrée du PI à l'intérieur des spores.

Dans notre étude, un kit Quantofix a été utilisé pour évaluer la quantité d'ions K^+ dans le milieu extracellulaire des spores. L'utilisation de ce kit est une méthode simple à mettre en œuvre et permet d'avoir une évaluation rapide de l'effet des molécules sur les flux d'ions K^+. En revanche, cette méthode ne permet pas d'obtenir des résultats très précis. D'autres méthodes existent pour obtenir des résultats quantitatifs comme par exemple l'utilisation d'une électrode spécifique aux ions potassium (Cox *et al.*, 1998).

Tout comme la modification de l'efflux de K^+, la modification du pH intracellulaire peut provoquer des disfonctionnements dans la cellule et notamment lors de la germination des spores. Des molécules antifongiques telles que l'acide nonanoïque perturbent le gradient de pH entre le milieu intra et extracellulaire ce qui inhibe la germination des spores de *Rhizopus oligosporus* (Breeuwer *et al.*, 1997). Par ailleurs, il semblerait que chez *Penicillium paneum* et *Candida albicans*, la germination soit accompagnée d'une augmentation du pH intracellulaire des spores (Chitarra *et al.*, 2005; Stewart *et al.*, 1988). Une modification du pH intracellulaire pourrait donc être à l'origine de l'inhibition de la germination des spores observée chez les deux champignons étudiés. La modification de pH intracellulaire des spores observées chez *F.*

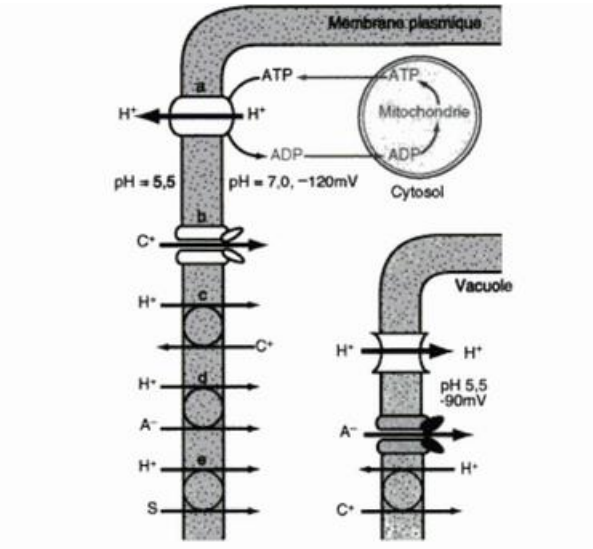


Figure 18 : Schéma montrant la relation entre l'activité d'une ATPase membranaire à protons et l'échange de solutés. La pompe à protons (a) utilise l'énergie de l'ATP pour établir un gradient de protons et une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane. L'énergie générée par le gradient de protons peut (b) activer un canal ionique ou (c) commander l'efflux d'ions de la cellule par un système antiport, ou provoquer un efflux d'ions (d) ou de soluté neutre (e) par un système de symport. Des pompes et des transporteurs similaires fonctionnent dans le tonoplaste (membrane vacuolaire). C^+ : cations ; A^- : anion ; C : soluté neutre. (Hopkins, 2003)

culmorum et *C. sativus* pourrait aussi être reliée à l'augmentation de l'efflux d'ions K^+. En effet, la diminution des ions K^+ dans la cellule peut provoquer un mouvement d'ions H^+ dans le milieu intracellulaire afin de maintenir l'équilibre des charges électriques. Ce mouvement de protons provoque alors une acidification du milieu. (Rodriguez-Navarro, 2000). Dans notre étude, la modification du pH intracellulaire n'est observée que pour le Méthyl Acrylate à 500 et 1000µM et ne concerne respectivement que 13.2 et 35.6% des spores de *F. culmorum*. Cet effet pourrait être la conséquence d'un mode d'action principal qui n'a pas encore été étudié. Cependant, ce résultat pourrait aussi être lié à la zone de virage de pH de cet indicateur coloré (Figure 7). En effet, la coloration au vert de malachite est modifiée pour des pH de 0.2 à 1.8 et de 11.5 à 13.2. Ainsi, une modification du pH intracellulaire des spores entre 1.8 et 11.5 peut avoir lieu sans que la coloration ne soit modifiée. Cette méthode ne permet donc de détecter que certaines variations de pH. L'utilisation de marqueurs fluorescents de type cFDA-SE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) en spectrofluorométrie (Chitarra *et al.*, 2005; Fisher and Phillips, 2009) pourrait résoudre ce problème.

L'étude présentée dans ce rapport a également permis de mettre en évidence une inhibition de l'acidification du milieu induite par le glucose par le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate sur les deux champignons. Tout comme l'efflux de K^+, cette inhibition peut être reliée à l'acidification du milieu intracellulaire. En effet, les pompes H^+/ATPases sont des éléments importants de la régulation du pH intracellulaire (Bhatia *et al.*, 2011; Kaur and Mishra, 1991). Elles permettent le déplacement actif des ions H^+ contre leur gradient de concentration en hydrolysant l'ATP en ADP et permettent ainsi de modifier le pH des différents compartiments cellulaires et donc de réguler de nombreux processus. Mais les pompes H^+/ATPases, en déplaçant les ions H^+ à travers la membrane, créent aussi un potentiel électrochimique permettant à des transports secondaires de se mettre en place (Rodriguez-Navarro, 2000). C'est le cas par exemple du transport d'ions K^+ à l'intérieur de la cellule mais également celui du transport de nutriments (Figure 18). L'expérience réalisée a mis en évidence une inhibition des pompes à protons de *F. culmorum* par le Méthyl Acrylate. Cependant pour *C. sativus*, il est difficile de déterminer si les pompes à protons sont inhibées ou au contraire stimulées. L'acidification globale calculée entre la mesure finale et la mesure initiale du pH est plus faible en présence des molécules, ce qui pourrait être expliqué par une inhibition des pompes à protons. Cependant, une acidification du milieu est malgré tout observée au moment du transfert du mycélium dans le glucose et donc lors de la toute première mesure de pH. Les molécules étudiées pourraient dans un premier temps stimuler de

façon importante les pompes à protons ce qui provoquerait l'acidification observée lors de cette première mesure. Portillo (2000) rapporte que certains stress comme la présence d'un acide faible ou d'éthanol, le traitement à la chaleur, le manque d'azote peuvent stimuler les pompes à protons causant alors des disfonctionnements cellulaires.

La modification du fonctionnement des pompes H^+/ATPases pourrait être dû à une perturbation du transporteur mais aussi à un manque de substrat de l'enzyme : l'ATP. Ce manque d'ATP pourrait s'expliquer par une inhibition de la respiration par exemple (Plumridge *et al.,* 2004). L'inhibition de la respiration cellulaire est probable en raison d'un groupement chimique commun entre le Méthyl Acrylate et les Strobilurines (Figure 5). Dans cette étude, l'inhibition de l'acidification du milieu induite par le glucose reste faible. Ainsi, malgré une concentration de 1000µM en Méthyl Propionate, l'acidification du milieu de *C. sativus* reste supérieure à 25%. Tout comme l'effet sur le pH intracellulaire, cet effet pourrait être la conséquence d'un mode d'action plus important ce qui expliquerait le faible effet observé. De plus, les deux molécules étudiées ont un effet différent selon l'espèce de champignon. Il semblerait que le Méthyl Acrylate agisse sur les pompes à protons de *F. culmorum* alors que le Méthyl Propionate agirait sur *C. sativus*. Le/les mode(s) d'action des molécules étudiées pourrai(en)t être différents d'une molécule et d'un champignon à l'autre.

Ainsi, les effets observés du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate sur l'efflux de K^+, la modification de pH intracellulaire et l'inhibition des pompes à protons peuvent être reliés entre eux. Cependant, il semble difficile de dire quel effet est la conséquence ou la cause de l'autre. Ces effets pourraient être la conséquence d'un autre mode d'action. Mais il est aussi probable que les molécules aient une action multi-site et combinent donc différents modes d'action qui en s'additionnant provoquent l'inhibition de la germination des spores et de la croissance mycélienne.

Origine du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate

A l'issue de cette étude, l'origine du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate est toujours inconnue. Aucune des modalités testées lors du prélèvement de molécules par SPME n'a permis de détecter l'une ou l'autre des molécules. De plus, ces molécules n'ont pas été détectées lorsque des racines d'orge sont inoculées avec *C. sativus* vivant contrairement aux résultats de Fiers *et al. (*2013). Les différences de résultats entre les différents milieux et temps de culture testés semblent indiquer une influence forte des conditions de culture des champignons sur l'émission de COVs. De plus, le développement du champignon influence

aussi fortement leur émission (Blom *et al.*, 2011; Insam and Seewald, 2010). Ceci pourrait expliquer les difficultés à détecter le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate dans les différents échantillons. Les conditions de cultures testées dans cette étude ont été choisies car elles sont décrites dans la littérature comme favorables à l'émission de molécules antifongiques (Morath *et al.*, 2012; Chitarra *et al.*, 2004; Bennett *et al.*, 2012). Ainsi, il ne semble pas que le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate soient émis par *C. sativus* en cas de compétition avec d'autres pathogènes ni en tant que self-inhibiteur pour réguler la population fongique.

Les conditions d'extraction des molécules ont également une forte influence sur les résultats obtenus. Malgré, la reproduction fidèle des conditions utilisées par M. Fiers (2013), d'autres facteurs peuvent influencer l'extraction comme par exemple la température de la pièce.

Si les analyses n'ont pas permis de détecter la présence de Méthyl Acrylate et de Méthyl Propionate, elles ont mis en évidence des molécules connues pour leur pouvoir antifongique comme c'est le cas du dimethyl sulfide (Lemfack *et al.*, 2014) probablement émis par les racines d'orge. Ces molécules volatiles d'origine biologique présentes donc un fort potentiel en protection des plantes.

Un deuxième protocole a été mis en place au début de l'étude pour déterminer l'origine des molécules. Ce protocole se base sur le fait que les méthyl esters libèrent du méthanol lors de leur hydrolyse en acide carboxylique en présence d'un acide. Or, le méthanol peut être dosé en spectrophotométrie à l'aide du Sodium Nitroprusside (Zhan *et al.*, 2010). L'objectif du protocole mis au point était donc de doser le méthanol produit lorsque l'on place le champignon ou la plante en présence d'acide sulfurique. La présence de méthanol indiquerait alors la présence d'un méthyl ester et permettrait donc de suspecter la présence du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate. Cependant, ce protocole n'a pas pu aboutir. En effet, il nécessite de broyer des racines d'orge mais aussi d'utiliser des suspensions de spores. Les échantillons doivent donc être centrifugés pour limiter les particules en suspension lors des lectures spectrophotométriques. Le surnageant est alors récupéré et utilisé pour les lectures spectrophotométriques. Or, il s'avère que la centrifugation entraine le réactif dans le culot ce qui empêche l'acquisition correcte des résultats.

V- Conclusion et Perspectives

Le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate semblent avoir une action sur la répartition des ions au sein de la cellule (modification du pH intracellulaire, efflux de K^+) ainsi que sur le fonctionnement des pompes à protons.

Ces résultats ont permis de donner des premiers éléments de réponse sur le mode d'action des deux molécules. Cependant, notre étude se focalise essentiellement sur les membranes. Or, il ne semble pas que ce mode d'action soit le mode d'action principal. En effet, les observations en microscopie à fluorescence montrent qu'il n'y a pas de modification majeure de la membrane. L'utilisation d'un microscope électronique pourrait permettre d'observer avec précision l'effet des molécules sur les membranes et les organites des spores, et confirmer de ce fait nos hypothèses ou en émettre de nouvelles.

D'autres modes d'action pourraient être mis en jeu dans l'activité antifongique des deux molécules étudiées. Il serait intéressant de tester l'effet des molécules sur la respiration cellulaire. De plus, certaines molécules antimicrobiennes agissent via d'autres modes d'action (Holm Freiesleben and Jäger, 2014). Par exemple, la molécule Plagiochin E isolée de la plante *Marchantia polymorpha* inhibe la synthèse de la chitine des parois de *Candida albicans* (WU *et al.*, 2008). Ce mode d'action pourrait être étudié dans un premier temps par microscopie électronique. De même, la molécule Sordarine synthétisée par le champignon *Sordaria araneosa* inhibe la synthèse de protéines impliquées dans l'élongation cellulaire, et provoque ainsi l'inhibition de la croissance de *Candida albicans* (Domínguez *et al.*, 1999; Liang, 2008). Il pourrait donc être envisagé de tester ces modes d'action pour le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate.

Concernant l'étude de l'origine des deux esters étudiés, d'autres conditions pourraient encore être testées comme la culture de *C. sativus* sur un milieu à base de caryopses d'orge autoclavés ou sur un milieu riche en extrait de malt. Ceci permettrait de mimer l'interaction entre l'orge et *C. sativus* sans que la plante ne soit présente de façon vivante pour émettre de molécules volatiles.

Enfin, de par leur activité antifongique, le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate constituent une perspective intéressante en protection des cultures et notamment pour lutter contre les champignons pathogènes contenus dans le sol. Cependant, ces molécules n'ont été testées qu'en milieu *in vitro*. Or, si les COVs sont capables de se déplacer sur de longues

distances à travers les pores du sol (Morath *et al.*, 2012), ils peuvent aussi être retenus par le sol selon les conditions. La rétention des COVs dans le sol est influencée par de nombreux paramètres tels que la température, le pH, l'humidité, mais aussi sa composition (Insam and Seewald, 2010). A plus long terme, il serait donc nécessaire de réaliser des tests en condition *in vivo* afin de déterminer si l'action de ces molécules est aussi forte qu'en condition *in vitro* et si les constituants du sol n'interfèrent pas avec leur activité. En effet, certains constituants du sol comme les argiles ont tendance à immobiliser les COVs et donc à empêcher leur diffusion vers leur lieu d'action (Insam and Seewald, 2010).

L'utilisation du Méthyl Acrylate et du Méthyl Propionate en tant que méthode de biocontrôle nécessite le développement d'une formulation adéquate afin de permettre la diffusion en continue de ces molécules dans le sol. Récemment, des billes d'alginate ont été développées pour permettre la diffusion lente de molécules volatiles intervenant dans l'attraction de parasitoïdes et de prédateurs de pucerons (Heuskin *et al.*, 2012). Cette formulation pourrait être adaptée à l'utilisation de COVs antifongiques dans le sol.

VI- Bibliographie

AHDB Cereals and Oilseeds Foot rot. Available at: http://cereals.ahdb.org.uk [Accessed May 2, 2016].

Arimura, G.I., Matsui, K. and Takabayashi, J. (2009) Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: Proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 911–923.

Balba, H. (2007) Review of strobilurin fungicide chemicals. *J. Environ. Sci. Health. B.*, **42**, 441–451.

BCCM/MUCL BCCM/MUCL Environmental and Applied Mycology. Available at: http://bccm.belspo.be/about-us/bccm-mucl [Accessed May 20, 2016].

Bennett, J.W., Ung, R.H., Ee, S.L. and Adhi, S.P. (2012) Fungal and Bacterial Volatile Organic Compounds : An Overview and Their Role as Ecological Signaling Agents. *mYCOTA IX*, 373–393.

Bhatia, R., Shreaz, S., Khan, N., Muralidhar, S., Basir, S.F., Manzoor, N. and Khan, L.A. (2011) Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. *J. Basic Microbiol.*, 1–9.

Bitas, V., Kim, H.-S., Bennett, J.W. and Kang, S. (2013) Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, **26**, 835–43. A

Blom, D., Fabbri, C., Connor, E.C., Schiestl, F.P., Klauser, D.R., Boller, T., Eberl, L. and Weisskopf, L. (2011) Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.*, **13**, 3047–3058.

Breeuwer, P., Reu, J.C. De, Drocourt, J.L., Rombouts, F.M. and Abee, T. (1997) Nonanoic acid, a fungal self-inhibitor, prevents germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores by dissipation of the pH gradient. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 178–185.

Burger, B. V., Petersen, W.G. and Tribe, G.D. (1995) Semiochemicals of the Scarabaeinae. IV: Identification of an attractant for the dung beetle *Pachylomerus femoralis* in the abdominal secretion of the dung beetle Kheper lamarcki. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.*, **50**, 675–680.

Chitarra, G.S., Abee, T., Rombouts, F.M. and Dijksterhuis, J. (2005) 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **54**, 67–75.

Chitarra, G.S., Abee, T., Rombouts, F.M., Posthumus, M. a and Dijksterhuis, J. (2004) Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol, a Volatile Self-Inhibitor. *Society*, **70**, 2823–2829.

Cox, S.D., Gustafson, J.E., Mann, C.M., Markham, J.L., Liew, Y.C., Hartland, R.P., Bell, H.C., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G. (1998) Tea tree oil causes K+ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 355–358.

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. and Wyllie, S.G. (2001) Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*, **6**, 87–91.

D'Mello, J.P.F. (1997) 3-Acetyl deoxynivalenol production in a strain of *Fusarium culmorum* insensitive to the fungicide difenoconazole. *Mycotoxin Res.*, **13**, 73–80.

Dawson, W.A.J.M., Jestoi, M., Rizzo, A., Nicholson, P. and Bateman, G.L. (2004) Field Evaluation of Fungal Competitors of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* , Causal Agents of Ear Blight of Winter Wheat, for the Control of Mycotoxin Production in Grain. *Biocontrol Sci. Technol.*, **14**, 783–799.

Delory, B.M., Delaplace, P., Fauconnier, M.L. and Jardin, P. du (2016) Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? *Plant Soil*, 1–26.

Diz, M.S.S., Carvalho, A.O., Rodrigues, R., et al. (2006) Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1760**, 1323–1332.

Domínguez, J.M., Gómez-Lorenzo, M.G. and Martín, J.J. (1999) Sordarin inhibits fungal protein synthesis by blocking translocation differently to fusidic acid. *J. Biol. Chem.*, **274**, 22423–22427.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D.A. and Orlova, I. (2006) Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, **25**, 417–440.

Ezra, D., Hess, W.M. and Strobel, G.A. (2004) New endophytic isolates of *Muscodor albus*, a volatile-antiobiotic-producing fungus. *Microbiology*, **150**, 4023–4031.

FAO (2014) Faostat. Available at: http://faostat.fao.org/ [Accessed February 3, 2016].

Fernando, W.G.D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S. and Savchuk, S.C. (2005) Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 955–964.

Fiers, M., Lognay, G., Fauconnier, M.-L. and Jijakli, M.H. (2013) Volatile compound-mediated interactions between barley and pathogenic fungi in the soil. *PLoS One*, **8**, e66805.

Fisher, K. and Phillips, C. (2009) The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.*, **106**, 1343–1349.

Groenhagen, U., Baumgartner, R., Bailly, A., Gardiner, A., Eberl, L., Schulz, S. and Weisskopf, L. (2013) Production of Bioactive Volatiles by Different *Burkholderia ambifaria* Strains. *J. Chem. Ecol.*, **39**, 892–906.

Heuskin, S., Lorge, S., Godin, B., et al. (2012) Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Manag. Sci.*, **68**, 127–136.

Holm Freiesleben, S. and Jäger, A.K. (2014) Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms – a review. *Med. Aromat. Plants*, **3**, Article ID 1000154 (1–6).

Hopkins, W.G. (2003) *Physiologie végétale* De Boeck S.,.

INRA (2016) E-PHYTIA : Identifier, Connaître, Maîtriser. Available at: http://ephytia.inra.fr/ [Accessed May 2, 2016].

Insam, H. and Seewald, M. (2010) Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biol. Fertil. Soils*, **46**, 199–213.

Kai, M., Vespermann, A. and Piechulla, B. (2008) The growth of fungi and *Arabidopsis thaliana* is influenced by bacterial volatiles. *Plant Signal Behav*, **3**, 482–484.

Karov, I., Mitrev, S. and Kostadinovska, E. (2009) *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph *Cochliobolus sativus*): Causer of barley leaf lesions and root rot in Macedonia. *Zb. Matice Srp. za Prir. Nauk.*, **4**, 167–174.

Kaur, S. and Mishra, P. (1991) Dimorphism-associated changes in plasma membrane H+-

ATPase activity of Candida albicans. *Arch. Microbiol.*, **156**, 412–415.

Kumar, J., Schäfer, P., Hückelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., Nagarajan, S. and Kogel, K.H. (2002) *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: Cytological and molecular approaches towards better control. *Mol. Plant Pathol.*, **3**, 185–195.

Kurek, E. and Jaroszuk-Scisel, J. (2003) Rye (Secale cereale) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biol. Control*, **26**, 48–56.

Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J. and Nychas, G.J.E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 453–462.

Lanoue, A., Burlat, V., Henkes, G.J., Koch, I., Schurr, U. and Röse, U.S.R. (2010) De novo biosynthesis of defense root exudates in response to Fusarium attack in barley. *New Phytol.*, **185**, 577–588.

Ledingham, R.J., Atkinson, T.G., Horricks, J.S., Mills, J.T., Piening, L.J. and Tinline, R.D. (1973) Wheat losses due to common root rot in the Prairie provinces of Canada, 1969-71. *Can. Plant Dis. Surv.*, **53**, 113–122.

Lemfack, M.C., Nickel, J., Dunkel, M., Preissner, R. and Piechulla, B. (2014) Microbial volatile organic compound database. *Nucleic Acids Res.*, **42**. A

Liang, H. (2008) Sordarin, an antifungal agent with a unique mode of action. *Beilstein J. Org. Chem.*, **4**, 1–14.

Luongo, L., Galli, M., Corazza, L., Meekes, E., Haas, L. De, Plas, C.L. Van Der and Köhl, J. (2005) Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium spp*. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Sci. Technol.*, **15**, 229–242.

Macías-Rubalcava, M.L., Hernández-Bautista, B.E., Oropeza, F., Duarte, G., González, M.C., Glenn, A.E., Hanlin, R.T. and Anaya, A.L. (2010) Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodor yucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. *J. Chem. Ecol.*, **36**, 1122–1131.

Mathre, D.E., Johnston, R.H. and Grey, W.E. (2003) Diagnosis of Common Root Rot of Wheat and Barley Plant Health Progress Plant Health Progress. *Plant Heal. Prog.*

Morath, S.U., Hung, R. and Bennett, J.W. (2012) Fungal volatile organic compounds: A

review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.*, **26**, 73–83.

Pherobase (2016) Pherobase. Available at: http://www.pherobase.com/ [Accessed May 23, 2016].

Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2002) The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 237–243.

Plumridge, A., Hesse, S.J.A., Watson, A.J., Lowe, K.C., Stratford, M. and Archer, D.B. (2004) The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3506–3511.

Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 31–42.

R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. Available at: http://www.r-project.org/ [Accessed February 6, 2016].

Ricke, S.C. (2003) Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult Sci*, **82**, 632–639.

Roberti, R., Veronesi, A., Cesari, A., Cascone, A., Berardino, I. Di, Bertini, L. and Caruso, C. (2008) Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys* rosea in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci.*, **175**, 339–347.

Rodriguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.*, **1469**, 1–30.

Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. and Migheli, Q. (2013) *Fusarium culmorum*: Causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol. Plant Pathol.*, **14**, 323–341.

Sikkema, J., Bont, J.A. de and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, **59**, 201–22.

Smiley, R.W., Gourlie, J., Easley, S., Patterson, L.-M. and Whittaker, R.G. (2005) Crop Damage Estimates for Crown Rot of Wheat and Barley in the Pacific Northwest. *Plant Dis.*, **89**, 595–604.

Stewart, E., Gow, N. and Bowen, D. (1988) Cytoplasmic Alkalinization during Germ Tube Formation in *Candida albicans*. , 1079–1087.

Strobel, G.A., Dirksie, E., Sears, J. and Markworth, C. (2001) Volatile antimicrobial from a novel endophytic fungus. *Microbiology*, **147**, 2943–2950.

Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y. and Wang, Y. (2012) The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens L.*) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One*, **7**, e30147.

Ullrich, S.E. (2011) *Barley: Production, Improvement, and Uses*,.

Wagacha, J.M. and Muthomi, J.W. (2007) *Fusarium culmorum*: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat. *Crop Prot.*, **26**, 877–885.

War, A.R., Sharma, H.C., Paulraj, M.G., War, M.Y. and Ignacimuthu, S. (2011) Herbivore induced plant volatiles: their role in plant defense for pest management. *Plant Signal. Behav.*, **6**, 1973–1978.

Weisskopf, L. (2013) The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytophathogenic fungi. *Microb. Pathog. Strateg. Combat. them Sci. Technol. Educ.*, 1352–1363.

WU, X.-Z., Cheng, A.-X., Sun, L.-M. and Lou, H.-X. (2008) Effect of plagiochin E, an antifungal macrocyclic bis(bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta Pharmacol. Sin.*, **29**.

Zhan, Y.-Y., Zhang, Y., Li, Q.-M. and Du, X.-Z. (2010) A Novel Visible Spectrophotometric Method for the Determination of Methanol Using Sodium Nitroprusside as Spectroscopic Probe. *J. Chinese Chem. Soc.*, **57**, 230–235.

ANNEXE

Annexe I : Mode d'emploi du Kit Quantofix® utilisé pour quantifier les ions K^+ présents dans le milieu extracellulaire

QUANTOFIX® Potassium

fr

Contenu :
1 boîte en aluminium avec 100 languettes test
2 flacons de potassium-1
2 tubes à essai

Domaine de mesure :
200–1500 mg/L

Echelons :
0 · 200 · 400 · 700 · 1000 · 1500 mg/L

Remarques générales :
Prélever seulement le nombre de languettes test nécessaires. Refermer la boîte immédiatement après. Éviter de toucher la zone de test.

Remarque spécifique au test :
La coloration rouge orangé du papier réactif inutilisé est normale, elle n'est pas un signe de décomposition des réactifs.

Mode d'emploi :
1. Placer le tube à essai dans l'emplacement prévu du portoir.
2. Verser 10 gouttes de potassium-1 (acide nitrique à 0,7 %).
3. Immerger la languette test pendant 1 s dans l'échantillon de pH neutre.
4. Éliminer l'excédent de liquide en secouant.
5. Placer la languette test dans le tube à essai avec le potassium-1 et attendre 60 secondes.
6. Éliminer l'excédent de liquide en secouant.
7. Comparer la zone de test avec l'échelle colorimétrique.

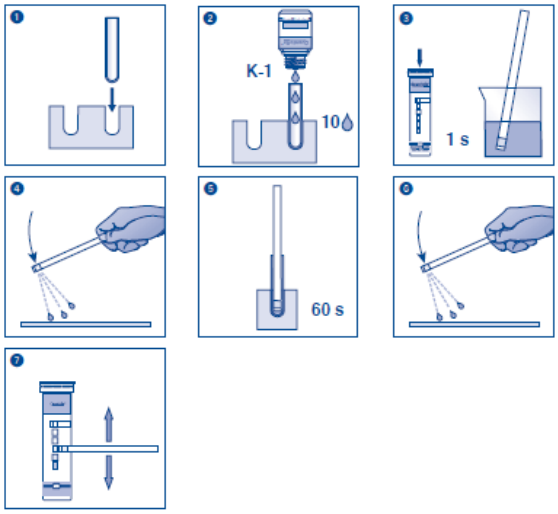
En présence d'ions de potassium, le papier réactif vire au jaune à rouge orangé.

Interférences :
Les ions de sodium interfèrent dans une concentration supérieure à 3000 mg/L ; ils peuvent donner des résultats trop faibles. Les ions suivants n'interfèrent pas :
< 1000 mg/L Al^{3+}, Ba^{2+}, Bi^{3+}, Ca^{2+}, $Fe^{2+/3+}$, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Sr^{2+}, Zn^{2+}
< 200 mg/L NH_4^+, $Hg^{+/2+}$, Tl^+
< 25 mg/L S^{2-}

Elimination :
Après usage, les échantillons d'analyse peuvent être jetés à l'égout avec de l'eau du robinet et ainsi acheminée à la station locale de traitement des eaux usées. Après usage, les languettes test peuvent être jetés à la poubelle.

Conservation et stabilité :
Ne pas exposer les languettes test à la lumière solaire. Conserver la boîte dans un endroit frais et sec (température maximale : +30 °C). Dans la mesure où les consignes énoncées sont respectées, le kit de test se conserve jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'emballage.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6–8 · 52355 Düren · Allemagne
Tél. : +49 24 21 969-0 · Fax : +49 24 21 969-199 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***
En France : MACHEREY-NAGEL EURL · 1, rue Gutenberg · 67722 Hoerdt · France
Tél. : 03 88 68 22 68 · Fax : 03 88 51 76 88 · sales-fr@mn-net.com



Haltbarkeitsdatum / Use by / A utiliser jusqu'à / Fecha de vencimiento / Houdbaarheidsdatum / Data di scadenza / Data ważności	LOT Chargenbezeichnung / Lot number / Numéro de lot / Número de lote / Lotnummer / No del lotto / Oznaczenie szarży
REF Artikelnummer / Catalog number / Référence / Art. nro. / Referentienummer / Codigo articolo / Numer artykułu	Packungsinhalt / Package content / Contenu de la boîte / Contenido del envase / Verpakkingsinhoud / Contenuto della confezione / Zawartość opakowania
Packung geschlossen halten / Keep container closed / Refermer la boîte / Mantenga el envase cerrado / Verpakking gesloten houden / Conservare la confezione chiusa / Przechowywać pojemnik szczelnie zamknięty	Vor Feuchtigkeit schützen / Protect from humidity / Protéger de l'humidité / Protéjase de la humedad / Beschermen tegen vocht / Proteggere dall'umidità / Chronić przed wilgocią
Lagertemperatur / Storage temperature / Température de stockage / Temperatura de almacenaje / Bewaartemperatuur / Temperatura di magazzinaggio / Temperatura przechowywania	Packungsbeilage lesen / Please read instructions / Lire les instructions, svp / Obsérvense las instrucciones de uso / Lees de bijsluiter / Leggere il foglio informativo / Należy przeczytać ulotkę informacyjną
Sicherheitshinweise in der Packungsbeilage beachten / Observe the safety precautions in instructions / Respecter les précautions de sécurité des instructions / Obsérvense las indicaciones de seguridad / Neem de veiligheidsrichtlijnen in de bijsluiter in acht / Seguire le avvertenze di sicurezza / Należy przestrzegać uwag zawartych w ulotce informacyjnej	

Rev 2013-05 A007748 / 913 16 / 0531

	Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : BioVIGPA Enseignant référent : Olivier Le Prince
Auteur(s) : Lucie Jallais Date de naissance* : 04/07/1991	Organisme d'accueil : Laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine Adresse : 13 avenue du Maréchal Juin 5030 Gembloux, Belgique Maître de stage : Caroline De Clerck
Nb pages : 61 Annexe(s) : 1	
Année de soutenance : 2016	

Titre français : Détermination du/des mode(s) d'action et de l'origine de deux composés organiques volatils émis lors de l'interaction entre l'orge et deux champignons pathogènes.

Titre anglais : Study of the modes of action and origin of two volatile organic compounds (VOCs) emitted during the interaction between barley and two pathogenic fungi.

Résumé (1600 caractères maximum) :

Le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate sont des composés organiques volatils (COVs) émis lors de l'interaction entre l'orge et le champignon pathogène Cochliobolus sativus. Ces deux esters inhibent la croissance et la germination des spores des deux agents de la pourriture racinaire de l'orge : Fusarium culmorum et Cochliobolus sativus.

Le mode d'action de ces deux molécules a été étudié en se focalisant principalement sur une action membranaire. Pour cela, différentes méthodes ont été utilisées. Cette étude s'est également intéressée à l'origine fongique ou végétale des deux esters via l'utilisation de techniques de prélèvement de COVs par Solid Phase Micro Extraction (SPME).

Le Méthyl Propionate et le Méthyl Acrylate semblent augmenter chez les deux champignons l'efflux d'ions K+ dès 500µM. Chez F. culmorum, une modification du pH intracellulaire est également observée en présence de Méthyl Acrylate à 500 et 1000µM. Enfin, à partir de 1000µM, le Méthyl Propionate semble provoquer l'inhibition des pompes à protons de C. sativus alors que le Méthyl Acrylate provoque l'inhibition des pompes à protons de F. culmorum.

Ces résultats semblent indiquer que les esters étudiés pourraient avoir un effet sur les membranes des spores, mais sans en menacer l'intégrité. Ceci a été confirmé par des observations réalisées par la suite en microscopie à fluorescence en présence d'iodure de propidium. Les effets observés pourraient aussi être la conséquence d'un autre mode d'action comme l'inhibition de la respiration cellulaire. Enfin, il est possible que le Méthyl Acrylate et le Méthyl Propionate possèdent des modes d'action distincts ou encore qu'ils agissent de façon différente sur chacun des deux champignons.

L'origine des deux esters n'a pas pu être déterminée par les méthodes utilisées.

Abstract (1600 caractères maximum) :

Methyl Acrylate and Methyl Propionate are two volatile organic compounds (VOCs) emitted during the interaction between barley and the pathogenic fungus Cochliobolus sativus. These two esters inhibit growth and spore germination of the causal agents of common root rot: Fusarium culmorum and Cochliobolus sativus.

The modes of action of these two molecules have been studied. To this end, different methods have been used. This study also examines the fungal or vegetal origin of these two esters using Solid Phase Micro Extraction (SPME) followed by GC-MS analyses.

Methyl Acrylate and Methyl Propionate seem to induce K+ leakage at concentration starting from 500µM on the two fungi. On F. culmorum, modification of intracellular pH is observed in the presence of Methyl Acrylate at 500µM and 1000µM. Finally, from 1000µM, Methyl Propionate seems to induce proton pumps inhibition of C. sativus whereas Methyl Acrylate induces inhibition of proton pumps of F. culmorum.

These results seem to show that the two esters could have an effect on spore membrane without threatening its integrity. This fact has been confirmed by fluorescent microscopic observations in the presence of propidium iodide. Effects observed could be consequences of another mode of action like inhibition of respiration. It is also possible that Methyl Acrylate and Methyl Propionate could have a different mechanism of action and/or that they act in a different way on each fungus.

This study failed to determine the origin of both esters with the methods used.

Mots-clés : Hordeum vulgare, pourriture racinaire, méthyl ester, composé antifongique, action membranaire.

Key Words : Hordeum vulgare, common root rot, methyl ester, antifungal compound, membrane action.

* *Elément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires*

Document à intégrer au mémoire