Rapport de Stage

Chandrodhay Saccaram

4 Mars 2019 – 30 Aout 2019

INRA
Unité GAFL
Allée des Chênes – CS 60094
84143 Montfavet Cedex
FRANCE

Identification de composés naturels de pêches affectant la pathogénicité de *Monilinia . Spp*.

Encadrants : Bénédicte Quilot-Turion, Marie-Noelle Corre, Laure Heutevin

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté leurs connaissances, leurs conseils ou simplement qui ont participé au bon déroulement de mon stage.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes maîtres de stage, Bénédicte Quilot-Turion, Marie-Noelle Corre et Laure Heurtevin, qui m'ont donné beaucoup d'autonomie, de confiance et qui ont su se montrer très présents lors de mon stage.

Merci à l'ensemble des membres du GAFL pour votre accueil chaleureux, votre gentillesse et votre générosité.

Je remercie aussi tous les stagiaires et doctorants qui ont facilité mon intégration et pour les moments conviviales passés avec eux.

Ce projet est soutenu financièrement par GIS Fruits. J'adresse mes remerciements au GIS Fruits pour le financement de mon allocation de stage. Les travaux ont été menés au GAFL à l'INRA d'Avignon en partenariat avec le GRAB et le Pôle Terralia. Ainsi j'adresse mes remerciement à l'Unité de Recherche GAFL de m'avoir accueilli, le GRAB et le Pole Terralia. Je remercie aussi l'Université de Montpellier pour m'avoir apporté les compétences théoriques et pratiques au cours du Master Diagnostique et Traçabilité des Environnements Chimiques et Biologiques.

Sommaire	Page
I. Introduction	1
1. Structure d'accueil	1
a. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)	1
b. Unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL)	1
2. Contexte scientifique	2
a. La pêche et le pêcher	2
b. La pourriture brune (Moniliose)	2
c. Objectif de l'étude	4
II. Matériels et méthodes	6
1. Préparation d'une suspension de spores	6
2. Préparation de la cutine	6
3. Milieux de culture pour l'induction de la cutinase	7
4. Molécules testées	7
5. Dispositifs expérimentaux pour l'induction de la cutinase	7
6. Quantification des protéines totales	8
a. Isolation des protéines dans le milieu de culture	8
b. Dosage par la méthode de Bradford	9
7. Mesure de l'activité enzymatique	9
8. Expression des gènes	9
a. Extraction d'ARN et synthèse de l'ADNc	9
b. PCR quantitative en temps réel RT-qPCR	10
9. Analyses statistiques	10
III. Résultats	11
1. Choix du milieu de culture	11
a. V8 et CZAPEK	11
b. CZAPEK-Glucose, CZAPEK-Cutine et CZAPEK-Glucose-Cutine	11

2. Test de l'effet d'une molécule ajoutée au milieu de culture sur la croissance mycélienne, la production de protéines extracellulaires et l'activité des cutinases	12
a. Evaluation de la quantité de mycélium produite	12
b. Quantification de protéines totales	12
c. Dosage de l'activité enzymatique de la cutinase	13
3. Expression des gènes	13
a. Extraction d'ARN totaux	13
b. PCR quantitative en temps réel RT-qPCR	13
IV. Discussions	14
1. Choix du milieu de culture	14
a. Milieu liquide permettant la croissance mycélienne	14
b. Milieu induisant la production de cutinases	14
2. Test de l'effet d'une molécule ajoutée au milieu de culture sur la croissance mycélienne, la production de protéines extracellulaires et l'activité des cutinases	14
3. Conformité des dispositifs expérimentaux mis au point à l'objectif final de l'étude	15
V. Conclusion et perspectives	
	17
Bibliographie et Webographie	
Annexe	

Liste des abréviations

ACQ	Acide Chlorogénique
ANOVA	Modèle statistique pour l'analyse de variance
ARN	Acide Ribonucléique
BSA	Bovin Serum Albumin
$CaCO_3$	Carbonate de calcium
CZAPEK	Milieu de culture pour champignon
DADI	DADI : Diversité, Adaptation, Déterminants et Intégration
EPST	Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique
EtOH	Ethanol
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
$FeSO_4$.7h2O	Sulfate de fer(II)
GAFL	Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes
I	
NRA	Institut National de la Recherche Agronomique
K_2HPO_4	Hydrogénophosphate de potassium
KCl	Chlorure de potassium
MfCut1	Gène de la cutinase
$MgSO_4.7H_2O$	Sulfate de magnésium
PNB	4-Nitrophényl butyrate
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RepBiol	Répétition Biologique
SG	Variété de peches Summergrand
UVProbe	Logiciel du spectrophotomètre Shimadzu
V8	Jus de légumes commerciales
VWR	Fournisseur de produit de laboratoire

I. Introduction

1. Structure d'accueil

a. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

L'INRA, organisme français de recherche en agronomie fondé en 1946, est un établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST). Il est sous la double tutelle du ministère chargé de la recherche et du ministère chargé de l'agriculture. Celui-ci est présent sur 17 centres régionaux avec plus de 150 sites en métropole et outre-mer. Grâce à ses partenariats avec les grands instituts de recherche scientifique dans le monde, les universités, l'enseignement agronomique et vétérinaire, l'INRA s'engage dans la construction de l'espace européen de la recherche. Ainsi, il est le premier institut de recherche agronomique en Europe et le deuxième dans le monde en nombre de publications en sciences agricoles, sciences de la plante et de l'animal. De ce fait, l'institut développe aussi de multiples collaborations et échanges avec la communauté scientifique internationale dans de nombreux pays en Europe, Amérique et Asie.

b. Unité Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL)

L'Unité GAFL, située au domaine Saint Maurice à Avignon, est centrée sur l'étude des espèces méditerranéennes. Les recherches au sein de cette unité sont développées autour de quatre axes thématiques: diversité des espèces et processus de domestication, bases génétiques et moléculaires de la qualité des fruits, caractérisation fonctionnelle des interactions plantes/pathogènes et gestion durable des résistances, intégration de la résistance aux maladies et de la qualité des fruits dans des innovations variétales. Celle-ci est aussi Centre de Ressources Biologique (CRB) pour les légumes de la famille des solanacées (aubergine, piment, tomate), les cucurbitacées, la laitue, et antenne du CRB-Prunus de l'Inra.

J'ai réalisé mon stage au sein de l'unité GAFL dans l'équipe scientifique Diversité, Adaptation, Déterminants et Intégration (DADI) dont le travail réside dans l'intégration multi-caractère de traits liés à la qualité des fruits, à la résistance aux ravageurs et à la régularité de production. Au sein de cette équipe, j'ai été plus précisément affecté sur la continuation du projet MoniBreF (financé par Agropolis Fondation) dont

l'objectif général est de contribuer à développer des moyens durables pour lutter contre la pourriture brune chez la pêche.

2. Contexte scientifique

a. La pêche et le pêcher

Le genre *prunus*, membre de la famille des *Rosaceae*, regroupe des centaines d'espèces qui sont importantes d'un point économique et agronomique. Celui-ci regroupe plusieurs fruitiers tels que, le pêcher, l'abricotier, le cerisier, le prunier et l'amandier. Parmi ceux-ci, le pêcher [*Prunus persica* (L.) Batsch] est cultivé dans plusieurs pays du monde possédant des climats tempérés. La Chine (21,3 MTon), les Etats-Unis (3,6 MTon), l'Espagne (2,1 MTon), l'Italie (2 MTon), et l'Iran (1,8 MTon) sont les cinq plus grands pays producteurs de ces fruits (FAOSTAT 2018). La Chine, quant à elle, possède la plus grande diversité génétique de pêches (Faust Miklos et Timon Bela, 1995 ; Kant Ravi, 2018). En effet, c'est le centre d'origine où a été domestiquée la pêche il y a plus de 4-5000 ans (Kant Ravi, 2018 ; Arazana et al., 2011 ; Hendrick, 1917). Par ailleurs, la pêche, fruit charnue, juteuse et sucrée est la quatrième culture fruitière la plus importante en Europe (France AgriMer).

Comme c'est le cas pour la plupart des espèces cultivées, les programmes de sélection des Prunus sont confrontés au besoin de trouver des solutions génétiques pour surpasser les problèmes posés par les maladies et ravageurs (virus, bactéries, champignons, insectes), ainsi que par les continuelles modifications environnementales liées au changement climatique. Cultivé et sélectionné depuis plus de 4 000 ans, le pêcher fait désormais partie des espèces séquencées, plaçant *P. persica* dans la catégorie des espèces d'arbres les mieux caractérisées génétiquement. Le séquençage complet du génome de pêcher, effectué par un consortium international en 2010, a permis d'élargir de nouvelles perspectives de recherches pour les arbres fruitiers.

b. La pourriture brune (Moniliose)

La Moniliose, aussi appelée pourriture brune, est une phytopathologie fongique causée par le genre *Monilinia spp.* qui est issu de l'embranchement des Ascomycètes. On distingue 35 espèces du genre *Monilinia* actuellement et de celles-ci, trois sont caractérisées comme étant pathogènes pour les prunus ; notamment *M. fructicola*, *M. laxa* et *M. fructigena* (Van Leeuwen et al., 1998, Lino et al., 2016). Ces

Figure 1 : Pêches infectées par trois différentes espèces de *Monilinia. spp.* (Lino et al., 2016)

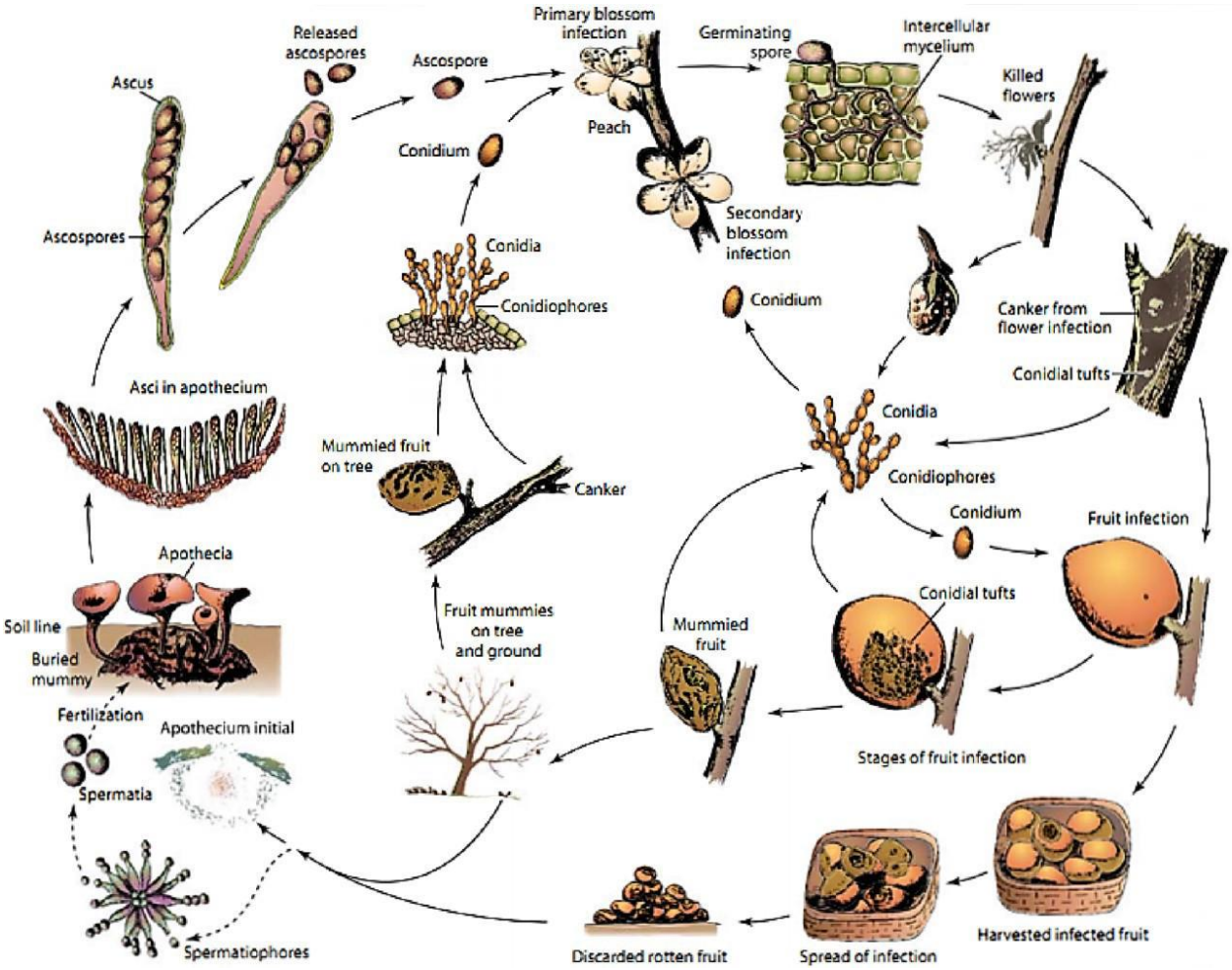

Figure 2 : Cycle reproductif de *Monilinia spp.* Image prise de Plant Pathology. Copyright 2005 Elsevier Limited.

trois espèces sont différenciables à l'œil nu (figure 1) sur les fruits des cultivars en serre (Mercier et al., 2009). Le champignon se reproduit principalement en multiplication asexuée (figure 2). Celui-ci se conserve durant l'hiver sous forme de sclérotes au sein de fruits momifiés qui restent accrochés à l'arbre. Au printemps des structures fructifères asexuées se forment sur les fruits momifiés et portent des conidies. Celle-ci sont dispersées (contamination primaire) par la pluie et le vent vers d'autres fruits ou fleurs en croissance sur les arbres. Ces conidies peuvent rester plusieurs mois sur l'hôte avant de germer quand les conditions d'humidité sont favorables ou quand l'organe végétal présente des blessures. Le mycélium se développe alors dans le fruit ou la fleur et sporule à nouveau (contamination secondaire) (Rungjindamai et al., 2014). Le champignon peut se reproduire sexuellement. Ce phénomène est très rare car il est très coûteux en énergie.

D'un point de vue général, *Monilinia* infecte les fruits soit en pénétrant directement par des microcracks cutanés préexistants (figure 3), soit en dégradant la cuticule et les tissus épidermiques (Wade et al., 1992). Pour ce faire, *Monilinia* possède un arsenal d'enzymes telles que des catalases, peroxydases et des estérases entre autres (Bostock et al., 1999). Mais les enzymes les plus importantes produites par ce champignon semblent être les cutinases nécessaires pour pénétrer les surfaces intactes des fruits (Bostock et al., 1999 ; Lee et al., 2010).

Les stades de développement des fruits sont essentiels pour comprendre l'épidémie de la maladie. En effet, les changements drastiques dans la physiologie des fruits et leur composition biochimique (Villarino et al., 2011 ; Dabbou et al., 2016) sont en phase avec les changements dans la sensibilité à l'infection par *Monilinia* (Biggs et al., 1998 ; Lee et al., 2007). La première étape commence après la fécondation des ovules, la chute des pétales et se termine lorsque le noyau commence à se lignifier. À ce stade, le fruit est photosynthétiquement actif, affiche une intense transpiration et possède la plus forte teneur en nutriments. Ces facteurs entraînent une forte sensibilité à la Moniliose, probablement du fait que les stomates sont actifs et offrent une possibilité d'entrée facile dans le fruit. La deuxième étape est la phase la plus résistante à l'infection par *Monilinia spp*. (De Cal et al., 2013; Kreidl et al., 2015). Cette étape est caractérisée par une activité métabolique intense de synthèse de composés secondaires, comme la catéchine, l'épicatéchine et les composés phénoliques qui sont produits à ce stade, associées à la lignification de l'endocarpe. Au troisième stade, l'expansion cellulaire est la plus élevée et la couleur change de

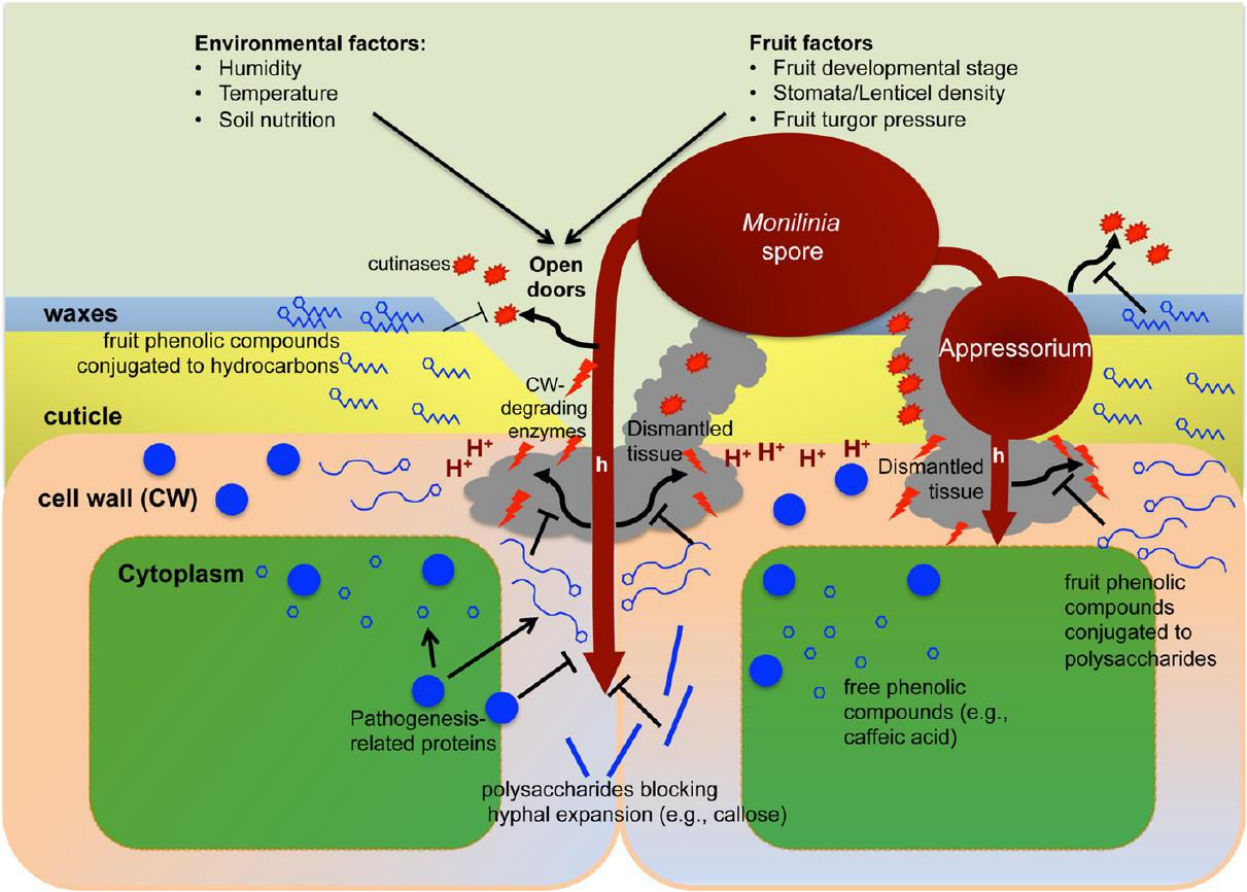

Figure 3 : L'attaque biochimique par les champignons *Monilinia. spp* pendant pendant la phase d'infection. (Lino et al., 2016)

verdâtre à jaune et rouge. Cette étape se termine par la maturité physiologique. Les fruits à noyau deviennent de plus en plus sensibles aux pathogènes à mesure qu'ils mûrissent, ce qui permet aux infections inactives de devenir actives et à de nouvelles infections de se développer. Associés à cette susceptibilité accrue, des changements structurels de la surface du fruit ont lieu, tels que des changements dans la composition des métabolites de la surface du fruit, l'amincissement et la fracturation de la cuticule, ce qui affecte structure et intégrité du mésocarpe des fruits (Bostock et al., 1999).

c. Objectif de l'étude

Au sein de l'INRA d'Avignon, les activités de recherche concernant le pêcher s'axent en partie autour d'un programme d'amélioration de la résistance à plusieurs ravageurs du pêcher (sharka, oïdium, puceron vert et cloque). Cette étude a débuté avec une population de pêcher créée au sein de l'unité GAFL. Cette population est issue d'un croisement entre un pêcher sauvage, *Prunus davidiana*, source de résistance face à plusieurs ravageurs (sharka, oïdium, puceron vert et cloque) mais possédant une très faible valeur agronomique, et Summergrand (SG), un cultivar. Plusieurs croisements ont par la suite été réalisés avec les hybrides pour donner une population de type pseudo-backcross 2, largement étudiée par l'équipe (Desnoues Elsa, 2015). Cette population très diverse a été testée pour la sensibilité à *Monilinia* par inoculation des fruits, en verger et en laboratoire. Parallèlement, des études biochimiques des éléments composant la surface des fruits (cires et épidermes) ont été réalisées. La comparaison des résultats de ces deux tests montre une corrélation entre une meilleure résistance à *Monilinia* et la présence en quantité importante de composés phénoliques et triterpénoïdes. Cela a permis d'émettre l'hypothèse que ces composés jouent peut-être un rôle dans l'établissement d'une résistance des fruits à la pourriture brune. Plus précisément, nous supposons que ces composés ont un effet inhibiteur de la production de cutinases, enzymes nécessaires pour la dégradation de la cutine en surface des fruits et donc pour la pénétration du champignon dans les fruits.

Ainsi, l'objectif de mon stage au sein de l'équipe a été de vérifier l'hypothèse préalablement établie ci-dessus. Pour ce faire, nous avons décidé de séparer l'étude de l'effet de ces composés en deux axes : une analyse biochimique de l'activité des cutinases produites par le champignon et une analyse de l'expression des gènes de

cutinase. La mise au point et les premières études ont porté sur *M. fructicola*, espèce la mieux décrite dans la littérature.

Dans un premier temps, nous avons étudié différents milieux de culture liquides pour favoriser la croissance du champignon et l'induction de la production de cutinases. Puis nous avons mis au point un protocole d'isolation des protéines (dont les enzymes : cutinases) sécrétées dans le milieu par le champignon. A suivi le développement d'une méthodologie pour mesurer l'activité enzymatique des cutinases. Par la suite, nous avons testé l'effet de l'ajout d'acide chlorogénique dans le milieu de culture sur la croissance du champignon, sur la quantité de protéines dans le milieu et sur l'activité enzymatique des cutinases. Cette molécule est un composé polyphénolique produit en quantité dans la pulpe et l'épiderme des pêches et dont l'activité antifongique est connue (Martinez et al., 2017).

Le deuxième axe a consisté en l'étude de l'expression des gènes de cutinase, notamment le gène MfCut1, décrit dans la bibliographie (Lee et al., 2010). Des extractions d'ARN du mycélium produits dans les diverses conditions étudiées ont été réalisées. Une rétrotranscription des ARN extraits en ADNc a été réalisée avant de procéder à l'amplification de ceux-ci par qPCR avec des amorces décrites dans la littérature.

II. Matériel et Méthodes

1. Préparation d'une suspension de spores

Une suspension de spores est préparée à partir d'une souche de *M. fructicola* maintenue sur du milieu gélosé à base de V8 (annexe 1) dans un incubateur à une température de 24°C avec un cycle de lumière de 12 heures par jour. Pour ce faire, 5 mL d'eau stérile sont ajoutés aux boites de *M. fructicola* en sporulation âgées de 7 jours. Les spores sont ensuite raclées à l'aide d'un râteau. La suspension est récoltée à l'aide d'une seringue et filtrée sur un filtre de nylon (Millipore, ref NY3002500) avec des pores de taille 30 µm pour retenir les fragments de mycélium. La cellule de Malassez est utilisée pour compter les spores afin de déterminer la concentration de la suspension. Pour ce faire, 17 µL de suspension de spores récoltées après filtration sont réparties dans les 2 chambres de comptage de la cellule de Malassez puis recouverte d'une lamelle. Le comptage des spores se réalise sous le microscope sur cinq rectangles dans chacune des deux chambres de comptage (10 au total). La concentration est déterminée d'après l'équation de la cellule de Malassez :

Concentration, spores/mL = [(Quantité de spores) x 10000) ÷ (Nombre de rectangles x dilution)]

Une fois la concentration de la suspension mère de spores déterminée, une dilution intermédiaire à 10^5 spores/mL est réalisée. Cette solution intermédiaire est utilisée par la suite pour l'inoculation.

2. Préparation de la cutine

La cutine a été préparée à partir des pelures de pommes de variétés Golden Delicious (Bostock et al., 1999). Les pommes ont été épluchées grossièrement dans un premier temps puis les pelures ont été raclées délicatement avec un couteau pour enlever les excédents de pulpe. Ces pelures sont ensuite stérilisées dans de l'eau portée à ébullition pendant 20 minutes, puis mises à sécher entre deux papiers essuie-tout pendant 24 heures. Après séchage, les peaux sont submergées dans un bain de chloroforme/méthanol (2:1) pendant 24 heures afin d'enlever les cires. Les pelures sont de nouveau séchées pendant 24 heures avant d'être soumises à un traitement de digestion enzymatique pour éliminer la cellulose et les pectines. La

Tableau 1 : Composition finale des différents milieux de cultures testés pour la croissance du champignon.

Milieu	**V8 clarifié**	**Czapek-Glucose**	**Czapek-Glucose-Cutine**	**Czapek-Cutine**
Composition	V8 diluée : 10% $CaCO_3$: 0,05% Glucose : 0,1 %	**Glucose : 0,1%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%	**Glucose : 0,1%** **Cutine : 0,1%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.	**Cutine : 0,1%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.

solution de digestion enzymatique est constituée de 0,5 % de cellulase (Sigma, C1184) et 0.1% de pectinase (Sigma, P2401) dans du tampon d'acétate de sodium à 0,05 mol/L. Les pelures sont immergées dans cette solution de digestion pendant une nuit à 35 °C. Par la suite, les pelures sont rincées avec de l'eau distillée et de l'éthanol 95% avant d'être séchées entre deux papiers buvard. Une fois sèches, les pelures sont broyées à l'aide d'un broyeur d'analyse (IKA® A11) et conservées à température ambiante dans un dessiccateur.

Une quantité de cette cutine sera introduite dans les milieux de culture afin de provoquer la production de cutinases par le champignon.

3. Milieux de culture pour l'induction de la cutinase

Un milieu liquide est nécessaire pour la culture du champignon afin de pouvoir isoler et doser la cutinase produite. Quatre milieux de culture liquides ont été testés pour la croissance des champignons (tableau 1). Un milieu de culture à base de V8 dilué et trois milieux CZAPEK avec différentes sources de carbone ont été réalisés dans cette étude de mise au point. Les pH des milieux sont ajustés à 7,0 puis les milieux autoclavés à 121°C pendant 20 minutes. La préparation détaillée avec les références des produits utilisés est présentée en annexe 2 et 3

4. Molécules testées

L'acide chlorogénique (ACQ) (Sigma, C3878) a été testé, dans un premier temps, afin de finaliser la mise au point. Pour ne pas dégrader la molécule, il a été nécessaire de la dissoudre dans un solvant organique, l'éthanol, puis d'ajouter de l'eau. Pour ce faire, deux solutions mères d'ACQ, 5 mmol/L et 10 mmol/L ont été préparées dans de l'éthanol 10%. A partir de ces solutions mères, deux conditions de milieux de culture avec une composition finale d'ACQ à 1 mmol/L et 2 mmol/L respectivement sont préparées (cf dispositif expérimentaux). L'ACQ étant sensible à la température, ce composé est rajouté dans le milieu après l'autoclavage et avant l'inoculation.

5. Dispositifs expérimentaux pour l'induction de la cutinase

L'étude de l'effet de l'ACQ sur l'induction de la cutinase a été réalisée, lors de deux essais (26 Avril et 21 Mai), dans différentes conditions de milieu et deux conditions

Tableau 2 : Composition finale des différents milieux de cultures testées pour la croissance du champignon du 26 Avril.

Milieu	**Czapek-Cutine**	**Czapek-Cutine-ACQ1mM**	**Czapek-Cutine-ACQ2mM**
Composition	**Cutine : 0,1%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.	**Cutine : 0,1%** **ACQ : 0,1%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.	**Cutine : 0,1%** **ACQ : 0,2%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.

Tableau 3 : Composition finale des différents milieux de cultures testées pour la croissance du champignon du 21 Mai.

Milieu	**Czapek-Cutine-EtOH**	**Czapek-Cutine-ACQ1mM**	**Czapek-Cutine-ACQ2mM**
Composition	**Cutine : 0,1%** **Ethanol : 0,2%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.	**Cutine : 0,1%** **ACQ : 0,1%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.	**Cutine : 0,1%** **ACQ : 0,2%** Extrait de levure : 0,1 % K_2HPO_4 : 0,1% $MgSO_4.7H_2O$: 0.1% KCl : 0,05% $FeSO_4$.7h2O : 0,002%.

de temps de culture de 13 jours (court) et de 20 jours (long). Le milieu de base utilisé pour les essais a été le CZAPEK avec de la cutine comme source de carbone (**CZAPEK-Cutine**). Un milieu contenant de l'éthanol à 2% (**CZAPEK-Cutine-EtOH**), un milieu contenant 1 mmol/L d'ACQ (**CZAPEK-Cutine-ACQ1mM**) et un milieu contenant 2 mmol/L d'ACQ (**CZAPEK-Cutine-ACQ2mM**) ont également été testés. Les compositions des milieux sont présentées dans les tableaux 2 et 3. Trois répétitions par conditions sont réalisées.

La culture des champignons a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 mL. 50 mL de milieu de culture (avec ou sans molécule) sont ainsi inoculés avec 500 µL d'une suspension de spores à 10^5 spores/mL (cf paragraphe 1). Etant données les contraintes liées aux molécules testées (thermosensibles, solubilisation dans de l'éthanol), la préparation des essais se déroulent en deux temps. Un milieu CZAPEK-Cutine "concentré" est réalisé en tenant compte que l'ajout de l'ACQ (préalablement dissout dans de l'éthanol) entraîne une dilution du milieu. Ce milieu concentré est réparti dans des erlenmeyers et autoclavé. Par la suite, la molécule à tester est rajoutée puis les erlens infectés par le champignon.

6. Quantification des protéines totales

a. Isolation des protéines dans le milieu de culture

Afin d'isoler les protéines sécrétées par le champignon, il est nécessaire de récupérer le milieu de culture sans contamination par le mycélium en croissance. Les milieux avec du mycélium sont donc filtrés sur un filtre de 5-13 µM (VWR, Cat. No. 516-0299). Dans le premier essai, le mycélium récolté sur les filtres a été pesé. Compte-tenu de la difficulté de cette étape, elle n'a pas été reconduite par la suite. Ainsi, pour les essais postérieurs, les mycéliums retenus dans les filtres sont récoltés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C pour l'extraction d'ARN. Une précipitation des protéines à l'acétone à froid est ensuite réalisée (Bostock et al., 1999), suivie d'une centrifugation à 15000g pour culotter les protéines. Le surnageant est éliminé et les culots de protéines sont séchés dans une cloche à vide pendant 24 heures. Par la suite, les culots sont solubilisés dans du tampon de phosphate de sodium à 0,05 mol/L avant de procéder à la quantification spectrophotométrique des protéines.

Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel pour le dosage de l'activité enzymatique de la cutinase.

Protéines isolées	500 µL	Équivaut à 5 µg de protéines extracellulaires
Triton X-100	100 µL	Solution de Triton X-100 à 0,4%
PNB (Sigma, N9876)	10 µL	Solution PNB à 1,76% (v/v) dans l'acétonitrile
Tampon phosphate de sodium	890 µL	Tampon à 0,05 mmol/L
Total	1500 µL	

b. Dosage par la méthode de Bradford

La quantification de protéines totales dans le milieu de culture après la croissance du champignon est réalisée par la méthode de Bradford. La Bovine Serum Albumine (BSA) est utilisée comme standard et l'absorbance est mesurée à 595 nm (Bradford Marion, 1976 ; Bostock et al., 1999). Pour chaque échantillon biologique, cinq répétitions techniques de mesure d'absorbance pour le dosage sont réalisées. Le protocole de dosage est représenté dans l'annexe 4.

Ensuite, des dilutions intermédiaires à 10 µg/mL de chacun des échantillons biologiques sont réalisées. Ceci permet par la suite de standardiser la mesure d'activité enzymatique.

7. Mesure de l'activité enzymatique

La mesure de l'activité enzymatique de la cutinase a été adaptée d'après des méthodes publiées (Bostock et al., 1999 ; Bonnen et al., 1989 ; Kolattukudy et al., 1981). Le p-Nitrophényl butyrate (Sigma, N9876) est utilisé comme substrat dans la réaction enzymatique. En présence de cutinases, celui-ci est transformé en 4-nitophenol, molécule de couleur jaune qui absorbe à 405 nm. Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 4.

Pour chacun des échantillons biologiques, trois répétitions techniques de mesure d'absorbance sont réalisées. Les activités enzymatiques ont été calculées automatiquement avec le logiciel UVProbe sur la partie linéaire de la courbe de cinétique de la réaction entre 300 et 1500 secondes. Les protocoles de préparation du p-Nitrophényl butyrate et les protocoles de la mesure des activités enzymatiques sont présentés dans l'annexe 5.

8. Expression des gènes

a. Extraction d'ARN et synthèse de l'ADNc

Les ARN totaux des mycéliums issus des différentes conditions de culture ont été extraits avec le kit d'extraction NucleoSpin® RNA Plant and Fungi (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG). Les ARN ont été quantifiés au Nanodrop ND1000 (Labtech France) et déposés sur gel d'agarose 1.5% RNase free afin de vérifier l'intégrité des ARN.

500ng d'ARN totaux ont été rétrotranscrits en utilisant le kit de RT-PCR AffinityScript Multi Temperature cDNA Synthesis (Agilent Technologies, USA).

b. PCR quantitative en temps réel RT-qPCR

Pour la qPCR, 2µl d'ADNc dilué au 1/10ème ont été utilisés avec 0.4µM de chaque primer, de l'eau stérile et le mix Brillant III UltraFast SYBR® Low Rox, pour un volume final de 15 µL. Le protocole de qPCR consiste en une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minutes, suivi de 40 cycles à 95°C (30s), 60°C (30s), suivi d'un cycle à 95°C (1 min), 55°C (30s) et 95°C (30s).

Les amorces utilisées sont des amorces spécifiques (annexe 6) du gène de la cutinase, MfCUT1, décrite dans la littérature (Lee et al., 2010). Le gène de ménage utilisé pour normaliser les données issues de la qpcr est Tubuline a, issu de l'article de Chou et al, 2015

9. Analyses statistiques

Les données acquises lors des tests *in vitro* seront analysées avec le logiciel R. Les différents facteurs et modalités étudiés seront comparés par une ANOVA sur mesures répétées avec effet aléatoire en utilisant la fonction lmer (linear mixed-effect regression) suivante :

```
ResMM<-lmer(Variable à expliquer ~ Variable explicatives +
(1|Répétition Biologique), data=a)
anova(ResMM)
```

Variables à expliquer :

- Concentration de protéines
- Activité enzymatique

Variables explicatives

- Composés phénoliques ou triterpénoïdes et leurs concentrations (Milieu)

Le test post-hoc HDS de Tukey sera utilisé afin d'effectuer des tests de comparaison multiple. On admet qu'il y a un effet significatif lorsque la p-value < 0,01.

Tableau 5 : Comparaison qualitative des milieux V8 et CZAPEK.

	V8	CZAPEK
Croissance du mycélium	Elevée	Moyenne
Concentration en protéines extracellulaire	Elevée	Moyenne

Tableau 6 : Comparaison qualitative des milieux CZAPEK avec différents sources de carbone.

	CZAPEK-Glucose	CZAPEK-Glucose-Cutine	CZAPEK-Cutine
Croissance du mycélium	Faible	Elevée	Moyenne
Concentration en protéines extracellulaire	Faible	Moyenne	Elevée

III. Résultats

1. Choix du milieu de culture

a. V8 et CZAPEK

La première étape de la mise au point était axée sur l'étude des différents milieux propices pour la culture de M. fructicola et M. laxa. Un milieu liquide à base de V8 ainsi que du milieu CZAPEK (avec du glucose comme source de carbone), décrits dans la littérature (Bostock et al., 1999), ont été testés.

Les deux milieux sont propices à la croissance du champignon. Le milieu V8 permet une meilleure croissance des deux champignons en termes de masse de mycélium produite par rapport au milieu CZAPEK.

Un dosage des protéines extracellulaires par la méthode de Bradford a été réalisé sur les milieux de culture après 7 jours de croissance (Tableau 5). La concentration en protéines totales est supérieure dans le milieu V8 que dans le CZAPEK.

Les milieux 'contrôle', V8 et CZAPEK sans inoculation de champignon, ont aussi été dosés par Bradford. Le V8 a démontré une présence élevée en protéines comparé au CZAPEK. Par conséquent, le CZAPEK a été choisi pour la suite des études.

b. CZAPEK-Glucose, CZAPEK-Cutine et CZAPEK-Glucose-Cutine

Dans un deuxième temps, le milieu CZAPEK avec différentes compositions en terme de sources de carbone a été testé avec *M.fructicola* : Czapek-Glucose, Czapek-Glucose-Cutine, Czapek-Cutine.

Les trois milieux ont démontré la capacité à faire croître le champignon après 20 jours de culture. Le milieu CZAPEK-Glucose-Cutine a induit la plus forte croissance et le milieu CZAPEK-Glucose la plus faible croissance en terme de masse de mycélium produite.

Par ailleurs, les trois milieux ont aussi démontré une capacité à induire la production et sécrétion des protéines extracellulaires qui ont été mesurées par la méthode de Bradford. En moyenne, les milieux CZAPEK-Cutine et CZAPEK-Glucose ont présenté la plus forte teneur et la plus faible teneur en protéines respectivement (tableau 6).Le milieu CZAPEK-Cutine a donc été choisi pour la suite des études car il favorise la production des protéines extracellulaires.

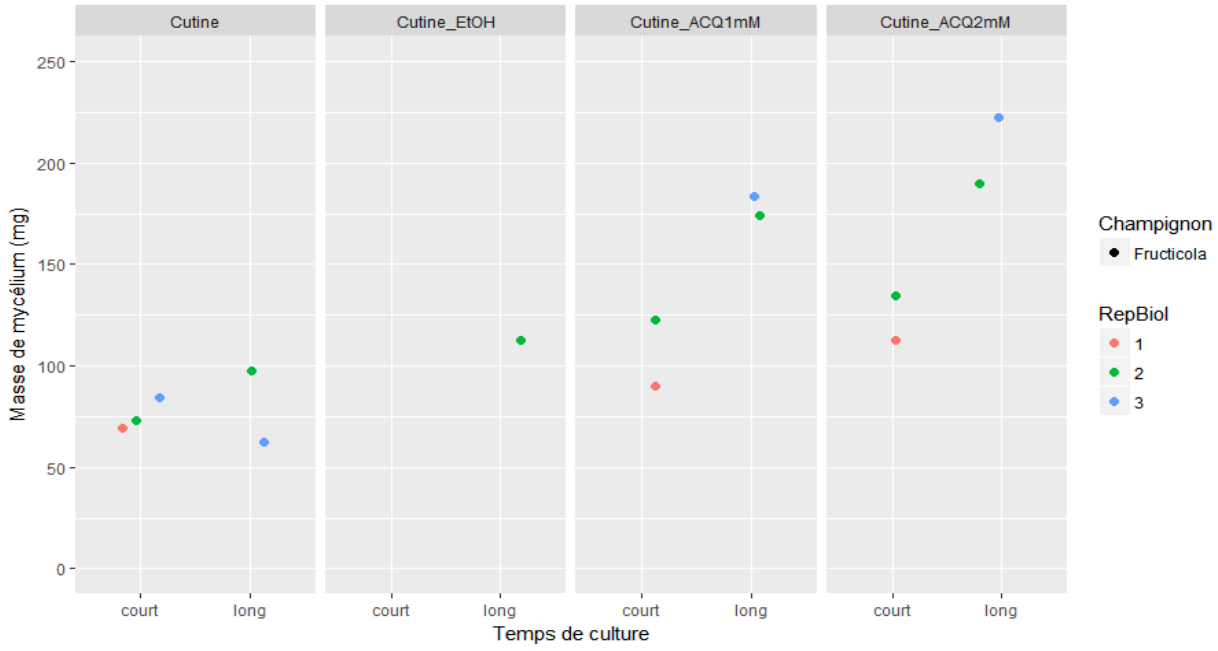

Figure 4 : Représentation graphique de la masse de mycélium récoltée dans différents milieux de cultures.

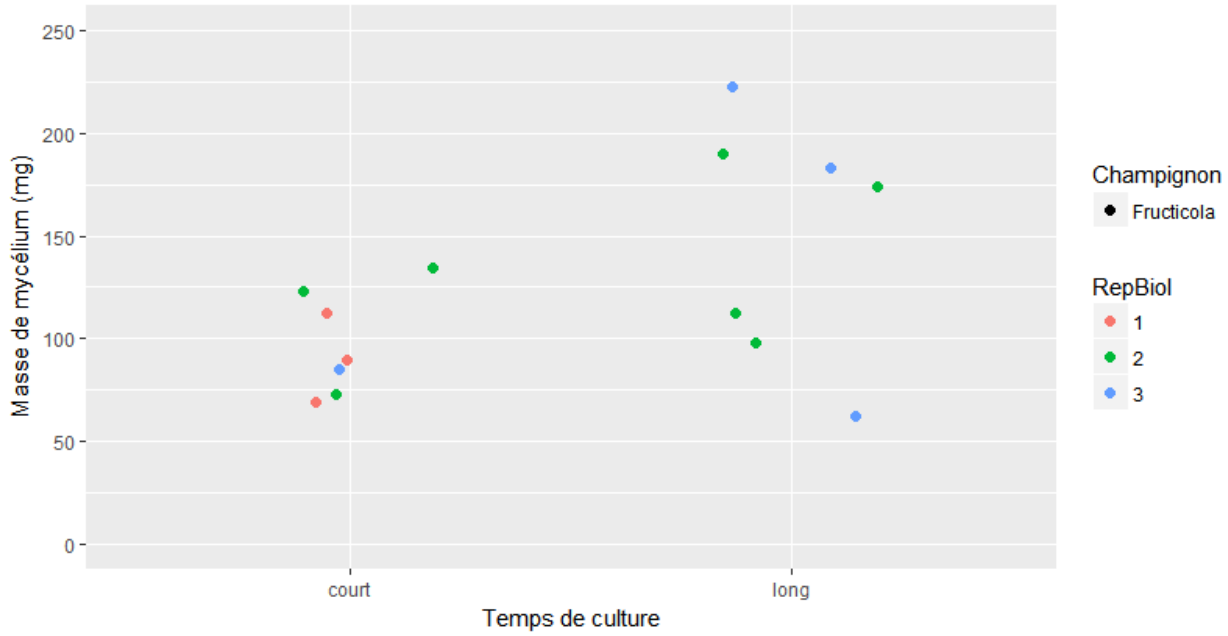

Figure 5 : Représentation graphique de la masse de mycélium récoltée pour des différents temps de culture.

2. Test de l'effet d'une molécule ajoutée au milieu de culture sur la croissance mycélienne, la production de protéines extracellulaires et l'activité des cutinases

Un premier essai (26 avril) a été réalisé pour étudier l'effet de l'ACQ. Le milieu CZAPEK-Cutine a été utilisé comme milieu de base pour les tests. Trois conditions de milieu de culture ont été réalisées sur une cinétique de 13 jours (court) et de 20 jours (long). Les trois conditions testées sont décrites dans le tableau 2.

Par la suite, un deuxième essai (21 mai) a été réalisé avec des modifications du milieu contrôle de façon à ce qu'il soit composé de 2% éthanol (tableau 3). Ce milieu CZAPEK-Cutine-EtOH a permis de standardiser les milieux pour permettre une meilleure comparaison entre les différentes conditions.

a. Evaluation de la quantité de mycélium produite

Pour le premier essai (26 avril), la quantité de mycélium produite a été évaluée. Un effet milieu (Figure 4) et temps de culture (Figure 5) a pu être observé.

D'un point de vue général, nous avons observé que la croissance du champignon est favorisée en présence de l'ACQ. A une concentration de 2 mmol/L, l'ACQ a provoqué une plus forte croissance qu'à une concentration de 1 mmoL/L. Une quantité négligeable de protéine a été observée pour le témoin, milieu de culture Cutine-EtOH non-inoculé par le champignon.

La croissance du champignon est aussi liée au temps de culture. Nous avons observé une masse plus élevée du champignon à 20 jours (temps long). Compte tenu des contraintes liées à la mesure de la masse de mycélium et le prélèvement de matière fraîche pour l'analyse d'expression des gènes en parallèle, cette variable n'a plus été mesurée.

b. Quantification de protéines totales

Les échantillons des deux essais ont été regroupés pour avoir un plus grand nombre de répétitions biologiques afin de mettre en évidence des tendances.

D'un point de vue général, nous avons observé que la production de protéines extracellulaires par le champignon est favorisée en présence de l'ACQ. A une concentration de 2mmol/L, l'ACQ a provoqué une plus forte production de protéines qu'à une concentration de 1 mmoL/L (figure 6).

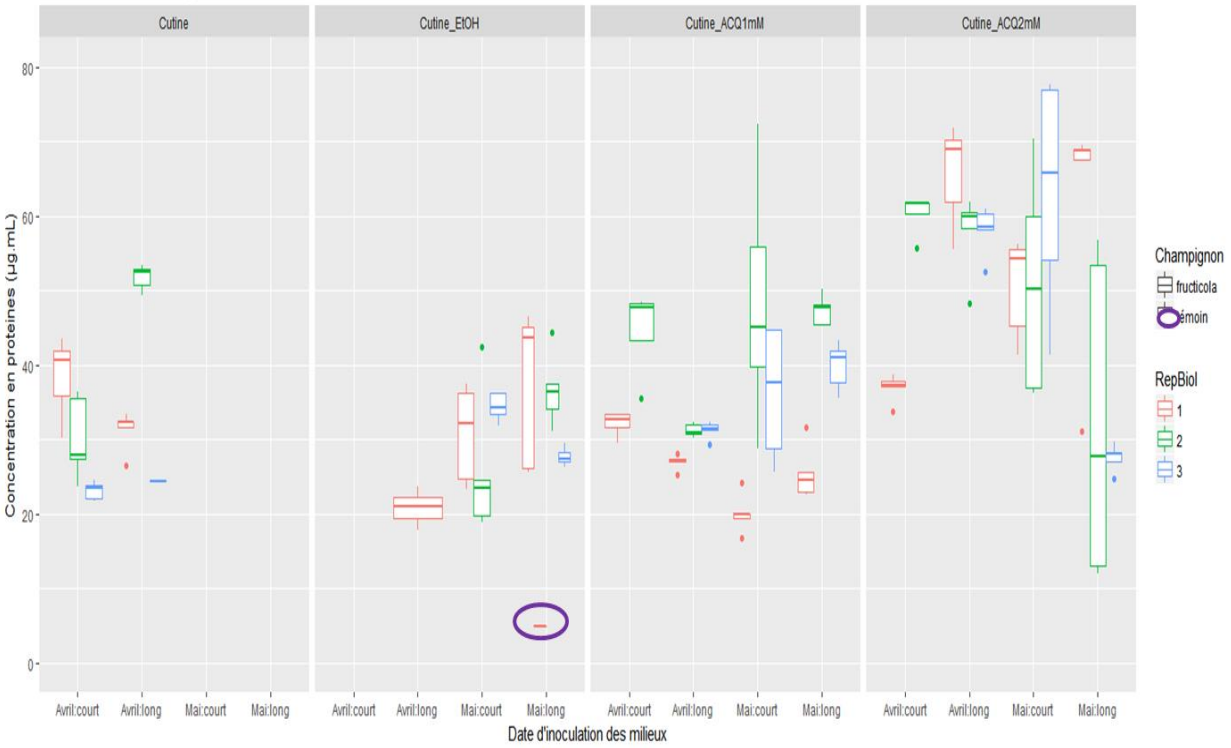

Figure 6 : Représentation graphique de la concentration en protéines extracellulaires pour les différents milieux de culture. Cinq répétitions techniques de dosage par Bradford ont été réalisées pour chaque échantillon biologique. Un milieu témoin (encerclé en violet). non-inoculé a aussi été dosé et celui-ci a présenté une quantité négligeable en protéine.

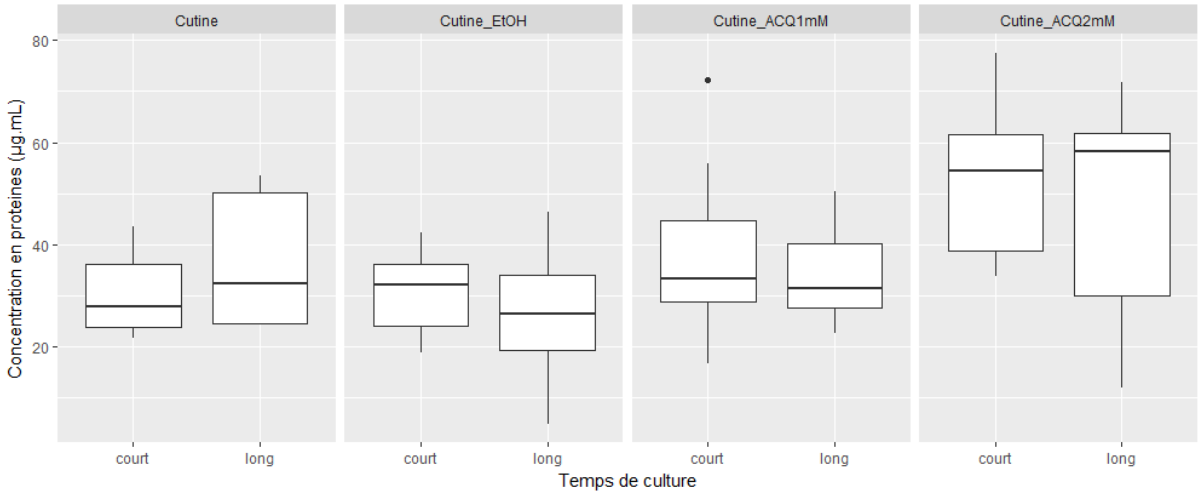

Figure 7 : Représentation en « boite à moustaches » de la concentration en protéines extracellulaires pour les différents temps de culture.

Pour voir si les différentes durées de temps de culture (13 et 20 jours) avaient une influence sur la production en protéines extracellulaires, nous avons représenté nos résultats dans la figure 7. Il ne semble pas avoir un effet de temps de culture d'après le graphique de la figure 7.

c. Dosage de l'activité enzymatique de la cutinase

Les échantillons des deux essais ont été regroupés de façon à avoir un plus grand nombre de répétitions biologiques afin de mettre en évidence des tendances.

D'un point de vue général, l'activité semble être plus élevée pour les milieux contenant de l'ACQ (figure 8). De plus, dans les milieux avec des concentrations d'ACQ de 1 mmol/L, l'activité de la cutinase semble être supérieure à celle mesurée dans les milieux avec des concentrations d'ACQ à 2 mmol/L.

3. Expression des gènes

a. Extraction d'ARN totaux

Les essais d'extraction d'ARN avec le protocole fourni par le kit d'extraction « NucleoSpin® RNA Plant and Fungi » de MACHEREY-NAGEL ont été réalisés avec succès. Nos échantillons ont présenté un bon ratio de pureté dans la majorité des cas.

b. PCR quantitative en temps réel RT-qPCR

Cette étape est toujours en cours et nous n'avons pas encore les résultats.

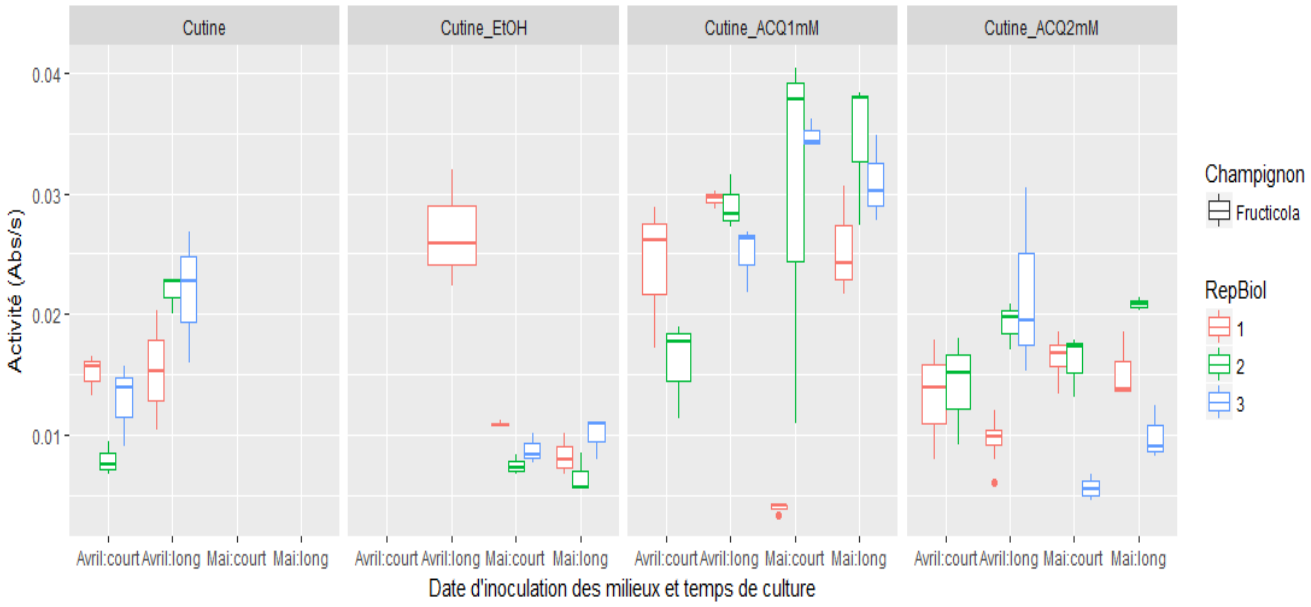

Figure 8 : Représentation graphique de l'activité de la cutinase dans les différents milieux de culture. Les échantillons des deux essais ont été regroupés dans cette figure et pour chaque répétition biologique, trois répétitions techniques ont été réalisées.

IV. Discussions

1. Choix du milieu de culture

a. Milieu liquide permettant la croissance mycélienne

Le milieu de culture à base de V8 a présenté une teneur élevée en protéines comparé au CZAPEK. Nous avons conclu que ces protéines pouvaient provenir du jus de V8 qui est un mélange de fruits et de légumes. Ainsi, pour réduire la part des protéines végétales issues du milieu V8 par rapport à celle des protéines secrétées par le champignon, le milieu CZAPEK a été choisi pour la suite des études.

b. Milieu induisant la production de cutinases

Un milieu pouvant induire la production de cutinases était nécessaire pour mener à bien notre étude. Dans cette optique, trois milieux CZAPEK avec différentes sources de carbone ont été testés (tableau 1).

Les trois milieux ont démontré une capacité à induire la production et sécrétion des protéines extracellulaires. Cependant, en moyenne, le milieu CZAPEK-Cutine, induit la production la plus élevée en protéines extracellulaires. Le milieu CZAPEK-Glucose n'entraîne pas une forte production en protéines extracellulaires sans doute car il ne comporte pas de cutine et donc n'induit pas la production de cutinases. Au contraire, le milieu CZAPEK-Cutine induit une forte production de protéines extracellulaires, sans doute des cutinases pour dégrader la cutine et l'utiliser comme nutriment car elle est la seule source de carbone dans le milieu. Aussi, le milieu CZAPEK-Cutine a été sélectionné comme milieu de base pour les essais dans lequel nous avons testé la molécule phénolique d'intérêt.

2. Test de l'effet d'une molécule ajoutée au milieu de culture sur la croissance mycélienne, la production de protéines extracellulaires et l'activité des cutinases

Les premiers essais ont démontré que le milieu utilisé a un effet sur la croissance du mycélium, la production de protéines extracellulaires et l'activité de la cutinase. Le temps de culture a, quant à lui, un effet sur la croissance de mycélium.

D'un point de vue global, l'activité de la cutinase est la plus élevée pour le milieu contenant de l'ACQ (figure 8). Cependant, l'activité enzymatique dans le milieu avec une concentration d'ACQ à 1 mmol/L est supérieure de celui à 2 mmol/L. Par contre,

le milieu contenant de l'ACQ à 2 mmol/L, induit une plus forte croissance en mycélium (figure 4) et une plus forte teneur en protéines extracellulaires (figure 6).
Au vu de ces résultats, nous avons supposé qu'à des petites concentrations d'ACQ (1 mmol/L), cette molécule pourrait agir comme molécule 'signal' activant la production de cutinases (figure 8). En effet, l'ACQ est présent dans des proportions équivalentes dans les pulpes des fruits. Pour explorer cette hypothèse, nous allons réaliser un essai avec du milieu CZAPEK sans cutine mais en présence d'ACQ à 1 mmol/L pour vérifier la production de cutinases. Cependant, à des plus fortes concentrations (2 mmol/L), l'ACQ semble inhiber l'activité enzymatique (figure 8), ce qui pourrait être la cause d'une plus forte production en protéines extracellulaires (figure 6) pour compenser la diminution de l'activité.
Nous ne pouvons conclure de façon plus précise avec ces premiers résultats du fait que la mise au point d'un dispositif optimal pour l'étude de ces composés est toujours en cours. Par ailleurs, lors de ces premiers essais, notre nombre d'échantillons étant limité, on ne peut qu'étudier des tendances générales et pas fournir des explications soutenues par des analyses statistiques.

3. Conformité des dispositifs expérimentaux mis au point à l'objectif final de l'étude

L'objectif final de l'étude étant de tester les différents composés phénoliques et triterpénoïdes présents dans les pelures de pêches moins sensibles au Monilinia. spp, il était nécessaire de mettre au point des dispositifs expérimentaux fiables pour confirmer nos hypothèses de départ. Les résultats obtenus de nos premiers essais ont été concluant d'un point de vue de conformité à notre étude.
Les méthodes de dosage des protéines et d'activité enzymatique nous ont démontré la fiabilité de nos protocoles. Les cinq répétitions techniques par dosage par la méthode de Bradford nous ont démontré une faible variation entre eux (figure 6). Ainsi, la seule variation semble provenir des échantillons biologiques.
La méthode de dosage de l'activité enzymatique s'est aussi prouvée fiable. Pour la majorité de nos échantillons, les répétitions techniques sont reproductibles (figure 8). Cependant, quelques variations techniques ont été observées pour certains échantillons. Nous supposons que ces variations sont dues à la fluctuation de température dans la chambre de mesure d'absorbance. En effet, nous avons constaté que la température de la chambre de mesure augmente au fur et à mesure

des analyses, qui ont été passées en séries dans une journée, à cause de la lampe. Pour les prochaines analyses, nous allons thermostater le portoir de cuves grâce à un système de circulation d'eau refroidie par un cryostat.

Les premiers essais ont été effectués sur différentes conditions de milieu et deux conditions de temps. Au vu du nombre de conditions testées et des contraintes des expériences, nous n'avons pas actuellement un nombre suffisant d'échantillons biologiques pour analyser statistiquement nos résultats. Nous avons uniquement observé certaines tendances. Cependant, lors des prochaines expériences, nous allons augmenter le nombre de réplicats biologiques. Etant donné que nous n'avons pas observé un effet temps sur nos échantillons (Figure 7) et qu'il y a activité de la cutinase pour les deux temps de culture, la condition à 20 jours sera éliminée lors des prochaines expériences.

De plus, nous allons pouvoir réaliser plusieurs expériences sur des dates différentes et par la suite rassembler toutes les données pour une analyse statistique plus robuste comme mentionné dans la partie matériele et méthode.

V. Conclusion et perspectives

L'étude réalisée au cours de ce stage nous a permis de mettre au point des dispositifs expérimentaux qui n'ont par le passé jamais été réalisés au sein de l'équipe. En effet, l'axe biochimique de l'étude a nécessité un travail de recherche bibliographique ainsi que de nombreux essais et d'optimisation pour obtenir des protocoles expérimentaux conformes à notre sujet de recherche. Les résultats préliminaires ont démontré une fiabilité de nos modes opératoires. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer quelques tendances de l'effet de l'ACQ sur la croissance de *M.fructicola* et la production de protéines extracellulaires, dont la cutinase, par celui-ci. Nous avons aussi démontré que l'ACQ influe sur l'activité enzymatique de la cutinase. Cependant, nos premiers résultats ont été différents de l'hypothèse établie au départ. En effet, nous avons constaté une plus forte activité enzymatique et une plus forte croissance du champignon en présence de l'ACQ alors que celui-ci est décrit comme étant anti-fongique dans la littérature (Martinez et al., 2017). Les résultats de l'expression des gènes de l'axe biologie moléculaire, dont les essais sont en cours nous apporteront plus d'éclaircissement sur cette étude.

La suite de l'étude consistera maintenant à optimiser ces dispositifs expérimentaux. En effet, nous allons maintenant procéder à augmenter le nombre de réplicats biologiques afin de pouvoir avoir des résultats qui seront interprétables statistiquement. De plus, il sera aussi nécessaire d'optimiser l'étape de culture de champignon en milieu liquide en réduisant le volume du milieu de culture. En effet, les prochaines étapes vont être de tester d'autres composés phénoliques et triterpénoïdes, dont certains sont disponibles en quantité limitée. Des tests vont aussi être réalisés sur des extraits de composés de surface de Pêche, obtenus par le laboratoire sur des fruits plus ou moins résistants. Une fois les protocoles mis au point sur *M.fructicola*, nous allons commencer nos tests sur *M.laxa*. En effet, *M.laxa* est l'espèce qui nous intéresse le plus au GAFL car elle est la plus commune sur le territoire français.

Références bibliographiques

1. Aranzana, M. J., Abbassi, E.-K., Howad, W. & Arús, P. (2010). Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. BMC Genetics. **11**, 69.

2. Biggs, A. & Northover, J. (1988). Early and Late-Season Susceptibility of Peach Fruits to *Monilinia fructicola*. Plant Disease **72**, 1070–1074.

3. Bonnen, A. M. & Hammerschmidt, R. (1989). Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenariumt*. Physiological and Molecular Plant Pathology 35, 463-474.

4. Bostock, R. M., Wilcox, S. M., Wang, G. & Adaskaveg, J. E. (1999). Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. Physiological and Molecular Plant Pathology **54**, 37–50.

5. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. **72**, 248–254.

6. Chou, C-M., Yu, F-Y., Yu, P-L., Ho, J-F., Bostock, R. M., Chung, K-R., Huang J-W., Lee, M-H. (2015). Expression of Five Endopolygalacturonase Genes and Demonstration that MfPG1 Overexpression Diminishes Virulence in the Brown Rot Pathogen *Monilinia fructicola*. PLoS ONE **10**, e0132012.

7. Dabbou, S., Lussiana, C., Maatallah, S., Gasco, L., Hajlaoui, H., Flamini, G. (2016). Changes in biochemical compounds in flesh and peel from Prunus persica fruits grown in Tunisia during two maturation stages. Plant Physiology and Biochemistry **100**, 1–11.

8. De Cal, A., Sandin-Espana, P., Martinez, F., Eguen, B., Chien-Ming, C., Lee, M.H., Melgarejo, P., Prusky, D. (2013). Role of gluconic acid and pH modulation in virulence of Monilinia fructicola on peach fruit. Postharvest Biology and Technology **86**, 418–423.

9. Desnoues Elsa. (2015). Du gène au phénotype : contrôle génétique et modélisation du métabolisme des sucres chez la pêche.

10. Faust, M. & Timon, B. (1995). Origin and dissemination of peach. Horticultural Reviews **17**, 331–379.

11. Hedrick, U. P., Howe, G. H. (1917). The peaches of New York. (Albany, J.B. Lyon Company, printers).

12. Kant, R. (2018). A Review on Peach (*Prunus persica*): An Asset of Medicinal Phytochemicals. IJRASET **6**, 2186–2200.

13. Kolattukudy, P. E., Purdy, R. E. & Maiti, I. B. (1981). Cutinases from fungi and pollen. Methods in Enzymology **71**, 652–664.

14. Kreidl, S., Edwards, J. & Villalta, O. N. (2015). Assessment of pathogenicity and infection requirements of Monilinia species causing brown rot of stone fruit in Australian orchards. Australasian Plant Pathology. **44**, 419–430.

15. Lee, M.-H. & Bostock, R. M. (2007). Fruit Exocarp Phenols in Relation to Quiescence and Development of *Monilinia fructicola* Infections in *Prunus spp*.: A Role for Cellular Redox? Phytopathology **97**, 269–277.

16. Lee, M.-H., Chiu, C.-M., Roubtsova, T., Chou, C.-M. & Bostock, R. M. (2010). Overexpression of a Redox-Regulated Cutinase Gene, MfCUT1 , Increases Virulence of the Brown Rot Pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus spp*. Molecular Plant-Microbe Interactions **23**, 176–186.

17. Martínez, G., Regente, M., Jacobi, S., Del Rio, M., Pinedo, M., de la Canal, L. (2017). Chlorogenic acid is a fungicide active against phytopathogenic fungi. Pesticide Biochemistry and Physiology **140**, 30–35.

18. Mercier, V., Martinot, G. & Deplaude, H. (2019). Monilioses du pêcher, déterminer les espèces et évaluer leur répartition : une méthode pour différencier les trois espèces d'agents de monilioses sur pêches dès le verger. Phytoma. La Défense des Végétaux.

19. Oliveira Lino, L., Pacheco, I., Mercier, V., Faoro, F., Bassi, D., Bornard, I., Quilot-Turion, B. (2016). Brown Rot Strikes *Prunus* Fruit: An Ancient Fight Almost Always Lost. J. Agric. Food Chem. **64**, 4029–4047.

20. Rungjindamai, N., Jeffries, P. & Xu, X.-M. (2014). Epidemiology and management of brown rot on stone fruit caused by Monilinia laxa. European Journal of Plant Pathology **140**, 1–17.

21. van Leeuwen, G. & van Kesteren, H. A. (1998). Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (Monilinia spp.) on the basis of quantitative characteristics. Can. J. Bot. **76**, 2042–2050.

22. Villarino, M., Sandín-España, P., Melgarejo, P. & De Cal, A. (2011). High Chlorogenic and Neochlorogenic Acid Levels in Immature Peaches Reduce Monilinia laxa Infection by Interfering with Fungal Melanin Biosynthesis. Journal of Agricultural Food Chemistry. **59**, 3205–3213.

23. Wade, G. C. & Cruickshank, R. H. (1992). Rapid Development of Resistance of Wounds on Immature Apricot Fruit to Infection with Monilinia fructicola. Journal of Phytopathology. **136**, 89–94.

Webographie

http://www.fao.org/faostat/en/#home

https://www.franceagrimer.fr/Bibliotheque/INFORMATIONS-ECONOMIQUES/FRUITS-ET-LEGUMES/CHIFFRES-ET-BILANS/2017/Les-filieres-des-fruits-et-legumes-Chiffres-cles-2016

Annexe 1

Milieu de culture gélosé à base V8

Objectif : Préparation d'un milieu de culture à base de V8 pour la maintien des souches de *Monilinia. spp*

Protocole

1. Préparer le milieu de culture d'après le tableau-ci-dessous

Composition de milieu de culture gélosé			
	Pour 1 L	**Pour 2 L**	**Pour 500 mL**
V8	200 mL	400 mL	100 mL
$CaCO_3$ (CAS : 471-34-1)	1 g	2 g	0,5 g
Glucose (Monohydrate, de chez Duchefa, CAS : 14431-43-7)	2 g	4 g	1 g
Extrait de levure (Duchefa, CAS : 8013-01-2)	2 g	4 g	1 g
Vitro Agar de chez Kalys	20 g	40 g	10 g
Eau distillée qsp	800 mL	1600 mL	400 mL
Ajuster le pH à 5,2			
Autoclave 20 minutes à 121 °C			

2. Repartir 15 mL de milieu de culture dans des boites de pétri de diamètre 90 mm

3. Laisser sécher le milieu pendant 20-30 minutes avant d'inoculer

4. Le milieu répartis dans des boites peut aussi être conservé à 4°C. Les boites sont refermées et scellés avec du parafilm avant le stockage.

Annexe 2

Test milieux de culture liquide pour *Monilinia. spp*

Objectif : Mettre au point un milieu de culture liquide, permettant après développement du champignon :

- Doser les cutinases dans le filtrat
- D'extraire l'ARN du champignon

A. Composition des milieux de culture

1. V8 clarifié (solution mère)

V8 clarifié (solution mère)			
V8	200 mL	400 mL	100 mL
$CaCO_3$ (CAS : 471-34-1)	1 g	2 g	0.5 g
Glucose (Monohydrate, de chez Duchefa, CAS : 14431-43-7)	2 g	4 g	1 g
Extrait de levure (Duchefa, CAS : 8013-01-2)	2 g	4 g	1 g
Ajuster le pH à 7,0			
Mélanger pendant 30 minutes			
Répartir en 50 mL de Falcon			
Centrifuger 4600 rpm pendant 30 minutes			
Filtration à travers du miracloth (22-25 µm)			

2. CZAPEK (modifié d'après C.M Chu et al., 2013)

Czapek modifié d'après *C.M.Chiu et al, 2013*			
	Pour 1 L	Pour 2 L	Pour 500 mL
Glucose (Monohydrate, de chez Duchefa, CAS : 14431-43-7)	1g	2g	0,5g
Extrait de levure (Duchefa, CAS : 8013-01-2)	1g	2g	0,5g
K_2HPO_4 (Prolabo ; 26930.293)	1g	2g	0,5g
$MgSO_4.7H_2O$ (VWR, CAS : 10034-99-8)	1,02g	2,04g	0,51g
KCl (VWR, CAS : 7447-40-7)	0,5g	1g	0,25g
$FeSO_4.7H_2O$ (Duchefa, CAS : 7782-63-0)	0,018g (18 mg)	0,036g (36 mg)	0,009g (9mg)
Qsp H_2O distillé	1000 mL	2000 mL	500 mL
Ajuster le pH à 7,0			

B. Protocole test de milieux

V8 (10%)	**Czapek**
Préparer 300ml : 30 ml V8 clarifié « mère » Ajouter 270 ml eau stérile	Préparer 1 L
Répartir dans 4 erlenmeyers (50ml/erlens) et refermer avec du coton cardé et du papier aluminium	
Autoclave à 121 °C pendant 20 minutes	
Inoculer chaque erlenmeyer avec 500 µL d'une suspension de spores à 10^5 spores/mL	

Annexe 3

Objectif : Tests des milieux de culture CZAPEK avec différent sources de carbone

Protocole :

1. Préparer 3 milieux de culture à base de CZAPEK mais avec différents sources de carbones (CZAPEK-Glucose, CZAPEK-Glucose-Cutine, CZAPEK-Cutine). 6 répétitions sont réaliser par milieux

2. Repartir les milieux dans des erlenmeyers qui sont renfermés avec du coton cardé et du papier d'aluminium. Les erlenmeyers contenant les milieux sont autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

3. Préparer une suspension de spores de *M. fructicola* à 10^5 spores/mL

4. Les erlenmeyers contenant les différents milieux sont inoculés avec 500 µL d'une suspension de spores à 10^5 spores/mL

5. Les erlenmeyers sont incubés à 24,5°C pendant 7 et 14 jours. 3 répétitions par conditions sont incubées pendant 7 jours et les 3 autres répétitions pendant 14 jours.

6. La croissance de mycélium est déterminée par pesée après l'arrêt de la culture et les protéines extracellulaires dans les filtrats mesurés par la méthode de Bradford.

Milieux : (Composition du Czapek-Glucose en annexe)

Czapek-Glucose	**Czapek-Glucose-Cutine 0.1%**	**Czapek-Cutine 0.1%***
Préparer **1000 ml** de solution mère Czapek sans le Glucose et sans ajuster le pH		
Prélever 400 ml Ajouter : 0.4g de glucose Ajuster le pH à 7.0	Prélever 300ml : Ajouter : 0.3g de glucose 0.3g de cutine Ajuster le pH à 7.0	Prélever 300ml Ajouter : 0.3g de cutine Ajuster le pH à 7.0
Répartir dans 6 erlens (50ml/erlen). Conserver le reste à -20°C	Répartir dans 6 erlens (50ml/erlen)	Répartir dans 6 erlens (50ml/erlen)
Autoclaver les erlens contenant les milieux, bouchés avec du coton cardé.		

Solution mère Czapek			
	Pour 1 L	Pour 2 L	Pour 500 mL
Extrait de levure (Duchefa, CAS : 8013-01-2)	1g	2g	0,5g
K_2HPO_4 (Prolabo ; 26930.293)	1g	2g	0,5g
$MgSO_4.7H_2O$ (VWR, CAS : 10034-99-8)	1,02g	2,04g	0,51g
KCl (VWR, CAS : 7447-40-7)	0,5g	1g	0,25g
$FeSO_4.7H_2O$ (Duchefa, CAS : 7782-63-0)	0,018g (18 mg)	0,036g (36 mg)	0,009g (9mg)
Qsp H_2O distillée	1000 mL	2000 mL	500 mL

Annexe 4

Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford

Objectif : Doser la concentration de protéine totale dans le milieu de culture de *M.laxa* ou *M.fructicola*

Matériel

- **Ingrédient**
  - BSA
  - Bradford reagent, B6916
  - Solution de protéine a mesuré

Tampon **phosphate** de sodium 0.05M à pH 7.0

- **Equipement**
  - Spectrophotomètre
  - Tubes

Procédure

1. Mélanger délicatement le réactif Bradford dans sa bouteille le ramener à température ambiante.
2. Préparer les concentrations standard de protéine (BSA) dans du tampon phosphate de sodium entre 1-10 µg/mL (se référer au tableau 1).
3. Ajouter 1 mL de solution de BSA de concentration connue dans des différents tubes.
4. 1 mL de la solution de protéine isolée est ajouté dans un tube bien annoté.
5. Préparer un blanc avec du solution tampon de phosphate de sodium.
6. Ajouter 1 mL de réactif de Bradford dans chaque tube contenant une solution de protéine inconnue et bien mélanger en vortexant. Cinq répétitions techniques sont réalisés par échantillons.
7. Laisser les tubes à température ambiante pendant 30 minutes.
8. Transférer dans des cuves.
9. Mesurer au spectrophotomètre à 595 nm et noter la DO.
10. Déterminer la concentration de protéine par rapport à courbe étalon.

Préparation des dilutions de BSA.

1. Préparer 5 mL d'une solution mère de BSA à 1 mg/mL en ajoutant 0.005g (5 mg) de BSA dans 5 mL de tampon phosphate de sodium.
2. Préparer une solution fille à 10 µg/mL (0,5 mL de solution mère + 49,5 mL de tampon).
3. A partir de cette solution fille (SF) préparer les autres concentrations connues de solution de BSA comme montré dans le tableau 1 ci-dessous.

µg/ml	0	2	4	6	8	10
Vol de SF	0	200	400	600	800	1000
Vol de Tp (µl)	1000	800	600	400	200	0

Annexe 5

Objectif : Mesure de l'activité enzymatique des cutinases secrétées dans les milieux de culture.

Protocole :

1. Préparation de la solution de PNB à 1,76 % dans du Acétonitrile
    - Ajouter 18 µL de PNB (Sigma, N9876) dans 982 µL d'acétonitrile

2. Des dilutions à 10 µg/mL de solution de protéine extracellulaires isolées sont réalisés dans du tampon phosphate de sodium à 0,05M

3. Un mélange réactionnel de l'échantillon à doser est réalisé dans des cuves de spectrophotométrie. La composition du mélange réactionnel est décrite dans le tableau ci-dessous.

Protéines isolées	500 µL	Équivaut à 5 µg de protéines extracellulaires
Triton X-100	100 µL	Solution de Triton X-100 à 0,4%
PNB (Sigma, N9876)	10 µL	Solution PNB à 1,76% (v/v) dans l'acétonitrile
Tampon phosphate de sodium	890 µL	Tampon à 0,05 mmol/L
Total	1500 µL	

4. Paramétrer le spectrophotomètre shimadzu (UV-2450) en mode cinétique grâce au logiciel UVProbe (version 2,21).

5. Paramétrer le temps total de la réaction à 4500 secondes

6. Paramétrer la longueur d'onde à 405 nm

7. Paramétrer la lecture de l'activité entre 300 et 1500 secondes (partie linéaire de la courbe cinétique).

Annexe 6

Amorces spécifiques de MfCut1 (Lee et al., 2010)

Gene	Primer	Sequence (5'–3')	Purpose
MfCUT1	Cut1-rt-F	GGATCCCCAGTTCAAGGTG	qRT-PCR
	Cut1-rt-R	GTCTCCGGCGTGACAGAT	qRT-PCR

Résumé

Mots-clés : *Monilinia. spp*, *Prunus*, acide chlorogénique (ACQ), cutinase, activité enzymatique

La Moniliose est une phytopathologie fongique causée par le genre *Monilinia spp*. Elle est responsable de perte de production importante chez le pêcher (*Prunus persica*). Ces champignons produisent un arsenal d'enzymes, dont des cutinases, pour dégrader les parois des fruits lors de l'infection. Des études ont démontré que les pêches les moins sensibles à cette maladie présentent des teneurs élevées en certains composés phénoliques et triterpénoïdes. Nous supposons que ces molécules affectent la pathogénicité du champignon en agissant sur la cutinase. Ainsi, l'objectif de ce stage a été de mettre au point des dispositifs expérimentaux d'un point de vue biochimique pour l'étude de l'effet de ces composés sur la cutinase. L'ACQ a été testé dans un premier temps et les résultats préliminaires nous ont montré que cette molécule a une tendance à favoriser la croissance et la production en protéines extracellulaires. Cependant, à des teneurs plus élevées, la tendance évolue vers l'inhibition de l'activité enzymatique. Les prochaines étapes de l'étude sont d'augmenter le nombre de réplicats biologiques pour avoir des résultats statistiquement interprétables et de tester les autres composés naturels. Dans un deuxième temps, les résultats d'expression de gènes permettront de confirmer nos résultats biochimiques.

Abstract

Keywords: *Monilinia spp.*, *Prunus*, chlorogenic acid, cutinase, enzyme activity

Brown rot is a fungal disease caused by *Monilinia. Spp*. It is responsible for significant peach (*Prunus persica*) crop losses worldwide. These fungi produce an arsenal of enzymes, including cutinase, in order to degrade fruit walls during infection. Studies have shown that peaches which are least susceptible to the disease have high levels of certain phenolic and triterpenoid compounds. We assume that these molecules affect the pathogenicity of the fungus by affecting the cutinase. As such, the objective of this internship was to develop a set of experimental biochemical protocols to study the effects of these naturally produced compounds on cutinase. Preliminary results with one such compound, chlorogenic acid, showed that growth and extracellular protein secretion was promoted. However, at higher concentration levels, the trend shifts towards inhibition of enzyme activity. Nevertheless, these preliminary results are issued from a small sample. Hence, the next step of the study would be to increase the number of biological replicas to have statistically interpretable results and also to test the effect of other phenolic and triterpenoid compounds. Moreover, results from the gene expression study, done in parallel and which is still in process, will help confirm our biochemical results.