

UNIVERSITÉ D'AVIGNON
ET DES PAYS DE VAUCLUSE

MASTER AGROSCIENCES

Gestion de la Qualité des Productions Végétales
2nde année

LATCHOUMANE Lorraine

Caractérisation de l'effet inhibiteur de métabolites secondaires de *Prunus persica* sur la croissance et la reproduction de *Monilinia* spp.

INRA d'Avignon

Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes



Encadrement : **Bénédicte QUILOT-TURION**, Directrice de Recherche
Marie-Noëlle CORRE, Assistante Ingénieure

Année Universitaire 2017 - 2018

Remerciements

Je remercie ma responsable de stage, Bénédicte Quilot-Turion, de m'avoir donné la chance de participer au projet de recherche MoniBref en effectuant un stage de 6 mois au sein de l'INRA d'Avignon. Merci pour ta confiance, ton encadrement et tes conseils. Un grand merci à Marie-Noëlle Corre, pour m'avoir guidé, enseigné, et avoir toujours été à l'écoute et disponible (et être une si bonne collègue !). Je remercie également Véronique Signoret et Laure Heurtevin pour leur aide et savoir-faire.

Merci à l'ensemble des membres du GAFL pour votre accueil chaleureux, votre gentillesse et votre générosité. Mille merci à vous, mes anciens collègues de travail et nouveaux amis, de m'avoir fait me sentir chez moi pendant ces 179 jours à vos côtés. Merci pour cette si bonne ambiance, ces pauses café détentes et constructives, ces fous rires et ces déjeuners si agréables au pied du micocoulier. Merci à toutes ces personnes pour leur temps, leur aide, leurs réponses à mes questions, et pour tout ce qu'elles ont pu m'apporter et apporter à ce travail.

Ce projet est soutenu financièrement par Agropolis Fondation sous la référence ID dans le cadre du 'Programme Investissements d'avenir' (Labex Agro : ANR-10-LABX-0001-01). J'adresse mes remerciements au GIS Fruits pour le financement de mon allocation de stage ; à l'Unité de Recherche GAFL de l'INRA d'Avignon pour m'avoir accueilli ; à l'Université d'Avignon pour m'avoir apporté les compétences théoriques et pratiques au cours du Master Gestion de la Qualité des Productions Végétales.



SOMMAIRE

I - INTRODUCTION	1
1. Contexte du stage.....	1
2. Présentation de la structure d'accueil : l'INRA	1
3. Synthèse bibliographique	2
a. Le pêcher	2
b. La pourriture brune causée par <i>Monilinia</i> spp.	3
c. Composition de l'épiderme de <i>Prunus persica</i>	4
d. Composés phénoliques et triterpénoïdes	4
4. Objectif du stage	6
II – MATERIEL ET METHODES	6
1. Matériel végétal	6
2. Extraction en masse de cires de nectarines	6
3. Préparation des extraits de cires pour les tests <i>in vitro</i>	7
4. Analyses biochimiques	7
5. Composés phénoliques et triterpénoïdes de synthèse	7
6. Préparation des milieux de culture pour les tests <i>in vitro</i>	8
7. Matériel fongique et conditions de croissance	8
8. Tests <i>in vitro</i>	9
a. Taux de germination des spores	9
b. Cinétique de croissance mycélienne	9
c. Sporulation	9
d. Capacité germinative de la nouvelle génération de spores	10
9. Analyses statistiques	10

III – RESULTATS ET DISCUSSION	11
1. Identification des composés phénoliques et triterpénoïdes	11
2. Tests <i>in vitro</i>	12
a. Cinétiques de croissance de <i>M. laxa</i>	12
Des composés inhibiteurs	13
Des composés et extraits activateurs	13
Des composés et extraits aux effets instables et peu importants	14
Des composés et extraits sans effet significatif sur la croissance mycélienne	14
b. Cinétiques de croissance de <i>M. fructicola</i>	15
c. Taux de germination des spores de <i>M. laxa</i>	15
d. Sporulation de <i>M. laxa</i> et <i>M. fructicola</i>	15
e. Capacité germinative de <i>M. laxa</i> et <i>M. fructicola</i>	16
IV – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	16
1. Amélioration à apporter aux tests <i>in vitro</i> réalisés	17
Sporulation et germination des spores	17
Intégrité du film de cires déposé.....	17
Stabilité des composés dans les milieux nutritifs.....	18
Concentration des composés dans les milieux nutritifs.....	18
2. Proposition de nouvelles expérimentations	18
Tests d'autres composés et de mélanges	18
Etude d'autres facteurs liés au pouvoir pathogène d champignon	19
Références bibliographiques	21

Annexes

I - INTRODUCTION

1. Contexte du stage

Le sujet de ce stage s'intègre dans le projet MoniBreF établi entre le Brésil (Embrapa) et la France (INRA), visant à étudier la pourriture brune du fruit chez le pêcher (*Prunus persica*). Plus particulièrement, ce projet vise à caractériser des composés phénoliques et triterpénoïdes de divers génotypes de pêcher comme défense naturelle contre les agents pathogènes responsables de la pourriture brune, *Monilinia* spp. L'objectif général est de limiter l'utilisation de produits phytosanitaires en développant des moyens de lutte efficaces et durables contre cette maladie. Cela permettrait de définir de nouvelles sources de résistances dans les programmes d'amélioration variétale afin d'obtenir des génotypes durablement résistants à *Monilinia* spp., et de favoriser le développement de biofongicides. Ce stage se concentre sur l'étude de deux génotypes de pêche, et de certains composés phénoliques et triterpénoïdes présents à la surface des fruits.

2. Présentation de la structure d'accueil : l'INRA

Créé en 1946, l'Institut National de la Recherche Agronomique est un organisme français placé sous la tutelle des Ministères chargés de l'Agriculture et de la Recherche. L'INRA possède plus de 150 installations présentes sur 17 centres régionaux, mais est également connu au niveau international car il a su développer des alliances à travers le monde avec des instituts Européens, Américains, et Asiatiques. Afin de répondre aux diverses problématiques axées sur la préservation de l'environnement, l'alimentation de qualité et l'agriculture durable, l'INRA cherche à améliorer les pratiques agricoles tout en prenant en compte les enjeux climatiques, énergétiques, territoriaux et de nutrition.

J'ai réalisé mon stage au sein de l'Unité de Recherche Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL), axée sur l'étude d'espèces méditerranéennes (tomate, piment, aubergine, melon, pêche ...). Cette unité a pour but de développer plusieurs thématiques : la diversité des espèces et processus de domestication, les bases génétiques et moléculaires de la qualité des fruits, la caractérisation fonctionnelle des interactions plantes/pathogènes et la gestion durable des résistances, ainsi que l'intégration de la résistance aux maladies et de la qualité des fruits dans des innovations variétales. Plus précisément, mon stage s'intègre dans l'équipe de recherche Diversité, Adaptation, Déterminants et Intégration (DADI). Dans un contexte de changement climatique, l'objectif de DADI est de développer des systèmes de production de qualité, à faible intrants, et adaptés aux environnements variables. Pour cela, l'équipe se concentre sur l'étude de la diversité des ressources génétiques, l'identification de nouveaux gènes et gèneurs d'intérêt, le fonctionnement des gènes dans des conditions de stress biotiques et abiotiques, et le développement de la sélection variétale pour des systèmes de production efficaces à faible niveau d'intrants.

3. Synthèse bibliographique

a. Le pêcher

La famille des Rosacées (Rosaceae) est composée de beaucoup d'espèces fruitières et forestières ayant une importance universelle à la fois économique et agronomique, puisqu'elles sont cultivées pour leurs fruits, leur bois, ou leur valeur ornementale. Parmi les Rosacées, les espèces dominantes sont réparties dans divers genres, notamment *Rosa* (rosiers), *Pyrus* (poiriers), *Malus* (pommiers), *Rubus* (mûres, framboisiers) ou encore *Prunus*.

Le genre *Prunus* comprend plus de 230 espèces végétales. Certaines sont cultivées pour leur caractère ornemental, tandis que d'autres produisent des fruits comestibles et mondialement commercialisés. Parmi ces dernières, plusieurs espèces représentent un intérêt économique, notamment les pêches et nectarines (*Prunus persica*), les abricots (*Prunus armeniaca*), les prunes (*Prunus domestica*), les cerises (*Prunus avium* et *Prunus cerasus*) et les amandes (*Prunus dulcis*). En effet, la production mondiale de ces *Prunus* est évaluée à 42,7 millions de tonnes (MT) pour l'année 2016. La Chine est le premier producteur mondial (21,3 MT), suivie par les Etats-Unis (3,6 MT), l'Espagne (2,1 MT), l'Italie (2 MT) et l'Iran (1,8 MT) (FAOSTAT 2018). Les pêches et nectarines sont les *Prunus* présentant le plus fort intérêt économique. En 2016, la production mondiale de pêche a atteint les 24,9 millions de tonnes (FAOSTAT 2018). Les premiers producteurs sont les pays asiatiques qui possèdent 70,2% du marché international, suivis par l'Europe (17,5%), l'Amérique (8,6%), l'Afrique (3,4%) et l'Océanie (0,3%) (FAOSTAT 2018).

L'espèce *P. persica* recense une grande diversité variétale puisqu'il existe plus de 300 variétés de pêchers. Cette espèce comprend à la fois les pêches et nectarines (*Prunus persica* L. Batsch), et d'autres variétés telles que les brugnons et les pavies. Ainsi, il existe des fruits avec ou sans duvet, dont la chair peut être blanche, jaune ou rouge, de taille, de forme et de goût différents. Cette diversité considérable, associée à l'importance économique de l'espèce pêcher font de celle-ci un modèle pour les *Prunus*. Par ailleurs, *P. persica* présente d'autres avantages faisant de celui-ci un élément déterminant pour la compréhension des espèces de Rosacées et d'autres familles. D'une part, le pêcher possède une courte période juvénile (2 à 3 ans) en comparaison à d'autres espèces fruitières pour lesquelles ce stade peut s'étendre jusqu'à 10 ans. D'autre part, il s'agit d'une espèce diploïde comprenant 8 paires de chromosomes, et dont le génome est relativement petit puisqu'il comporte 265 millions de paires de bases.

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 continues 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 génétiquement caractérisées. Le séquençage complet du génome de pêcher, effectué par un consortium international en 2010, a permis d'élargir de nouvelles perspectives de recherches, tant pour les arbres fruitiers que pour les espèces d'arbres forestiers.



Figure 1 : *Monilinia laxa* sur *Prunus persica*

b. La pourriture brune causée par *Monilinia* spp.

La moniliose, également appelée pourriture brune, est la plus importante maladie fongique affectant les fruits à noyau (Fan et al. 2010). L'agent pathogène responsable de la moniliose est un champignon appartenant au genre *Monilinia*. Il se développe principalement sur les espèces végétales appartenant aux familles Rosaceae et Ericaceae, et est responsable des plus importantes pertes économiques chez les espèces de *Prunus*, notamment pour les cultivars les plus commercialisés de pêches, nectarines, cerises, prunes, abricots et amandes (Hong et al. 1997 ; Hu et al. 2011 ; Lee et Bostock 2007). Sur une trentaine d'espèces de *Monilinia* spp. recensées, trois d'entre-elles provoquent la pourriture brune chez les *Prunus*, à savoir *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, *Monilinia fructigena* (Aderhold & Ruhland) Honey, et *Monilinia laxa* (Aderhold & Ruhland) Honey (Figure 1).

Cette maladie fongique est largement répandue à travers le monde puisqu'on la retrouve en Chine, Europe, Etats-Unis, Canada, Australie, et Nouvelle-Zélande (Hong et al. 1997). La période d'infection est relativement longue puisqu'elle s'étend depuis la formation des bourgeons floraux jusqu'à l'après-récolte. En effet, ces champignons peuvent infecter les fleurs, les fruits, et les rameaux, provoquant alors le dépérissement de ces organes et l'apparition de pourriture brune sur des fruits immatures et matures (Fan et al. 2010). Les pertes après-récolte sont généralement plus sévères que les pertes avant-récolte et se produisent habituellement au cours de la manipulation, du transport et du stockage des fruits (Hong et al. 1997 ; Villarino et al. 2016). Ces pertes peuvent atteindre 25 % de la production, d'autant plus que les fruits deviennent davantage sensibles à *Monilinia* lors de leur maturation (Pascal et al. 1994). Les conditions météorologiques imprévisibles, le stade de développement du fruit, et les difficultés liées à l'application de fongicides peuvent entraîner des pertes excédant souvent 50 % de la production (Feliciano et al. 1987 ; Lee et al. 2007). Les pratiques culturales actuelles reposent principalement sur l'utilisation répétée de fongicides chimiques afin de prévenir l'infection des fruits par *Monilinia* (Bostock et al. 1999). Ces traitements sont extrêmement néfastes, aussi bien d'un point de vue économique, sanitaire, qu'environnemental. L'opinion publique tolère de moins en moins la présence de pesticides dans notre chaîne alimentaire, ce qui mène à l'utilisation plus stricte de fongicides, notamment pour les traitements réalisés à l'approche de la récolte (Wilson et al. 1987). De plus, la fréquence d'application des fongicides réduit leur efficacité sur les pathogènes qui acquièrent alors une certaine résistance à ces produits de synthèse. Une alternative vise à réduire l'emploi de produits chimiques en les remplaçant par des agents de biocontrôle capables d'éliminer le pathogène ou de produire des substances inhibitrices du pathogène. Par exemple, pour lutter contre *M. laxa* et *M. fructicola*, Yáñez-Mendizábal et al. (2012) ont mis en évidence que la bactérie *Bacillus subtilis* possède une forte activité fongicide associée à la production de fengycine, un composé antibiotique. De nouvelles stratégies doivent donc être mises en place afin de réduire et contrôler efficacement les maladies fongiques en favorisant les méthodes respectueuses de l'environnement.

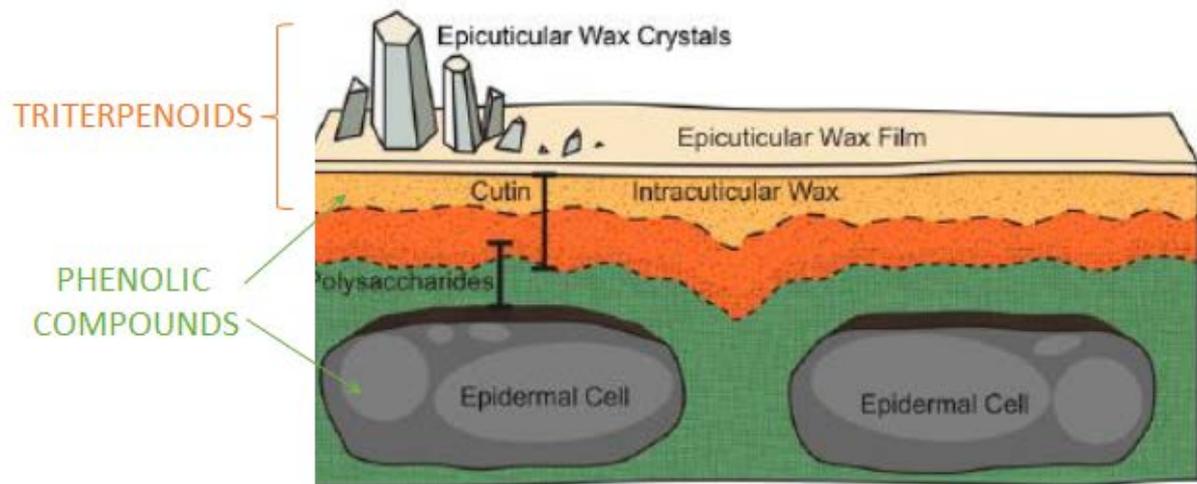


Figure 2 : Schéma descriptif de la composition de l'épiderme de fruit et de la localisation des composés phénoliques et triterpénoïdes.

c. Composition de l'épiderme de *Prunus persica*

L'épiderme des fruits est la première surface de contact entre le fruit et le pathogène. Cette couche est composée de cellules épidermiques recouvertes d'une cuticule, elle-même formée de cires et de cutine (un polymère formant un réseau lipidique suite à l'assemblage d'acides gras hydroxy-estérifiés en C16 et/ou C18, lié aux cellules épidermiques par des polysaccharides (Fernandez et al. 2011)). En plus de conférer aux plantes une protection limitant les pertes d'eau et échanges gazeux, l'impact des radiations UV ou encore des polluants atmosphériques, la cuticule joue un rôle majeur dans la défense des plantes contre les pathogènes et ravageurs (Belge et al. 2014a et 2014b ; Chen et al. 2014 ; Kunst et Samuels 2003). Elle constitue en effet une barrière aussi bien physique que chimique contre les agressions. Ces fonctions de la cuticule sont associées à la présence de cires cuticulaires, composées de dérivés d'acides gras, formant une couche hydrophobe à la surface de l'épiderme (Kunst et Samuels 2003 ; Pensec et al. 2014). Il existe deux catégories de cires : les cires intracuticulaires qui sont incorporées dans la cutine, et les cires épicuticulaires que l'on retrouve sur l'extérieur du fruit sous forme d'un film lisse et/ou de cristaux. La composition des cires détermine l'effet protecteur de la cuticule contre les stress biotiques et abiotiques. Cela inclut notamment des métabolites secondaires, tels que des composés organiques volatils, des composés phénoliques et des triterpénoïdes. Ces composés de cires agissent en tant que substances allélochimiques puisqu'ils influent sur le développement de micro-organismes pathogènes et/ou le comportement d'insectes et herbivores (Jetter et Schaffer 2001). La concentration des facteurs chimiques et physiques présents à la surface des fruits diffère en fonction du stade phénologique (Prusky 1996). Certains composés peuvent alors avoir un effet inhibiteur, stimulateur, voire neutre sur le pathogène. Cela explique la diversité de résistance qui existe au sein de fruits ayant des stades de développement différents (Lee et Bostock 2007).

d. Composés phénoliques et triterpénoïdes

Divers composés sont connus pour leur rôle dans la défense des plantes vis-à-vis de pathogènes et ravageurs, dont les triterpénoïdes et les composés phénoliques (Figure 2).

Parmi les terpènes, les triterpénoïdes sont présents dans les cires, à la surface des plantes (fruits, tiges, feuilles), et représentent les métabolites secondaires les plus largement répandus chez les plantes, avec près de 30 000 structures identifiées à ce jour. Ils possèdent des activités biologiques diverses, notamment pour les acides ursolique, oléanolique, bétulinique, maslinique et corosolique (Furtado et al. 2017 ; Rufino-Palomares et al. 2015). En effet, les triterpénoïdes ont des effets bénéfiques pour la santé humaine, incluant leurs activités anti-inflammatoires, cardio-protectrices, antioxydantes, ou encore anti-tumorales (Furtado et al. 2017). Par ailleurs, un grand nombre de triterpénoïdes ont été rapportés comme ayant des propriétés antibactériennes, antivirales, et antifongiques (Jesus et al. 2015 ; Yin et al. 2011). Ces composés présents dans les cires peuvent également servir de défense lors d'interactions entre les plantes et leur environnement, notamment contre des organismes phytophages et phytotrophes. Par exemple, sur les feuilles de *Prunus laurocerasus*, les composés des cires ont un rôle protecteur contre les insectes piqueurs-suceurs ou encore les pathogènes et ravageurs de contact (Jetter et al. 2000). De la même manière, les triterpénoïdes présents en surface des poires (*Pyrus bretschneideri* Rehd. cv.

Pingguoli) ont un effet inhibiteur sur la germination des spores et le développement mycélien du champignon pathogène *Alternaria alternata*, l'agent responsable de la pourriture chez les poiriers (Yin et al. 2011 ; Lara et al. 2014). Lv et al. (2016) mettent en avant que chez les pommiers, les teneurs en acides oléanolique et ursolique varient en fonction des cultivars, mais également leur exposition au soleil. Cet exemple montre bien que des concentrations plus élevées en triterpénoïdes peuvent être obtenues en sélectionnant les géotypes les plus performants dans les programmes d'amélioration variétale, et en utilisant des pratiques culturales favorisant la synthèse de ces métabolites secondaires. La présence des triterpénoïdes dans les cires cuticulaires de fruits représentent un intérêt majeur du à leurs rôles dans la protection contre des stress biotiques et abiotiques, ainsi que leurs avantages pour la santé (Lv et al. 2015 ; Pensec et al. 2014).

De même, les composés phénoliques, présents au sein des cellules épidermiques et des cires, sont impliqués dans la défense des fruits contre des pathogènes, et possèdent des fonctions antioxydantes et antimicrobiennes (Radovanović et al. 2013 ; Hammerschmidt et al. 2014). Ainsi, en contribuant aux bénéfices pour la santé, aux propriétés organoleptiques, et à la protection des fruits, les composés phénoliques constituent un paramètre important pour évaluer la qualité des fruits (Santin et al. 2018). Ces composés sont principalement accumulés dans les couches de l'épiderme des fruits (Andreotti et al. 2008), et généralement synthétisés en réponse à un stress biotique ou abiotique (Santin et al. 2018 ; Zhang and Tsao 2016). Les acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés, notamment l'acide chlorogénique et l'acide caféique, ainsi que les flavanols catéchine et épicatechine, sont les composés phénoliques majoritairement présents dans l'épiderme et les couches cellulaires sous-jacentes des pêches (Bostock et al. 1999). Mikulic Petkovsek et al. (2011) décrivent une augmentation des acides hydroxycinnamiques, de catéchine et d'épicatechine dans les tissus de pomme (*Malus domestica*) infectés par le champignon pathogène *Venturia inaequalis*. De même, les quantités de flavanols dans les feuilles de poires (*Pyrus communis*) infectées par *Gymnosporangium sabinae* apparaissent six fois supérieures à celles de feuilles saines (Treutter et Feucht 1990). Par ailleurs, les concentrations en acides chlorogénique et caféique sont plus importantes pour les géotypes de pêche présentant un niveau de résistance élevé (Bolinha) à *M. fructicola* (Bostock et al. 1999 ; Villarino et al. 2011 ; Lara et al. 2014). Bostock et al. (1999) mettent en évidence que ces concentrations déclinent au cours de la maturation du fruit, inversement à la sensibilité à la pourriture brune pour les géotypes sensibles à cette maladie. Les composés phénoliques seraient ainsi impliqués dans le pouvoir pathogène de certains champignons, notamment la germination des spores, la croissance du mycélium, ou encore la production de facteurs nécessaires à la pénétration du pathogène dans l'organisme hôte.

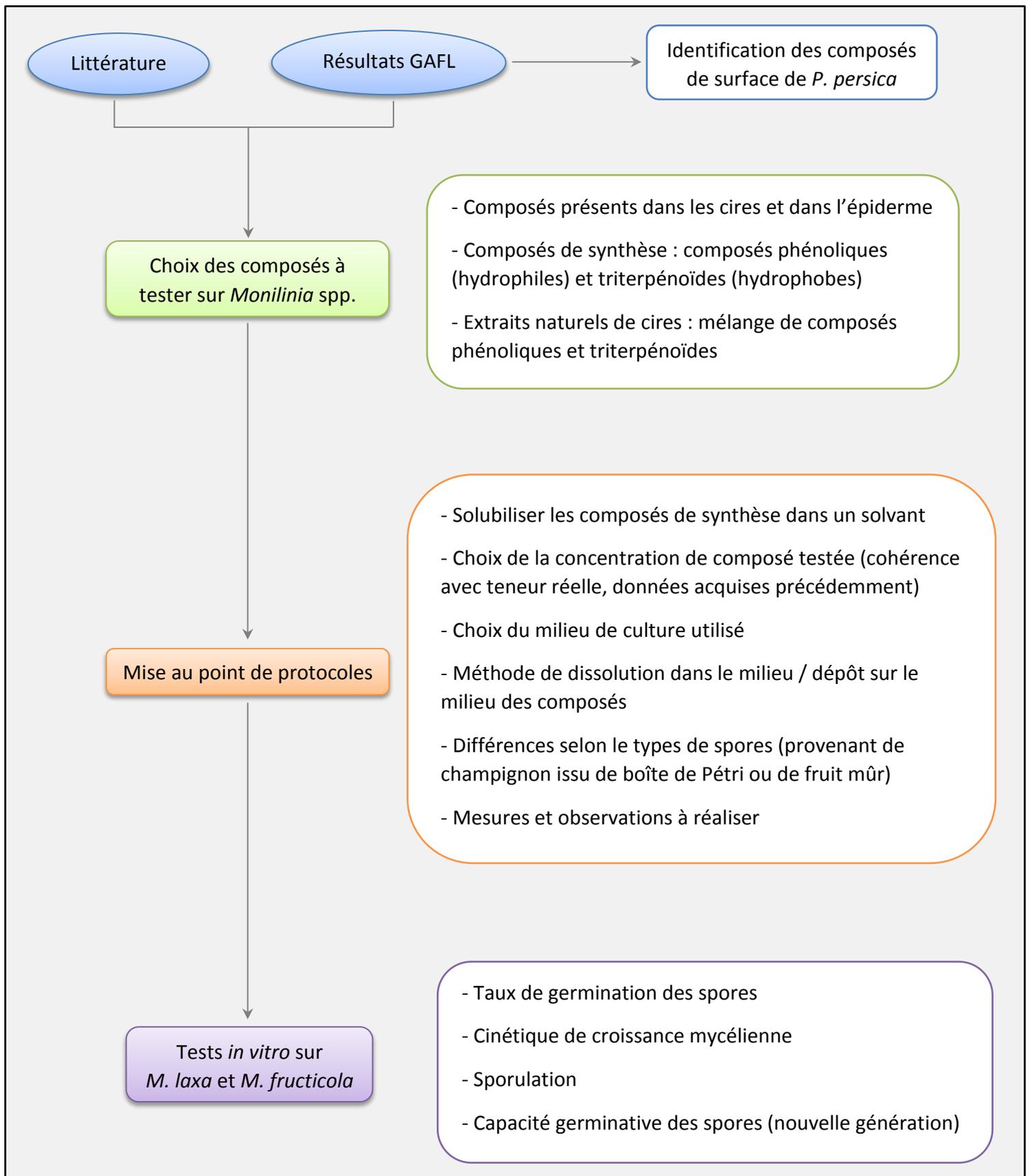


Figure 3 : Stratégie abordée pour répondre aux objectifs du stage

4. Objectif du stage

L'objectif de ce stage porte sur l'étude de l'effet de composés phénoliques et triterpénoïdes présents à la surface des fruits de pêcher vis-à-vis des pathogènes *M. laxa* et *M. fructicola*. Le but de cette étude est de mettre au point une méthode et tester *in vitro* l'effet fongicide que peuvent avoir divers composés sur la germination des spores, le développement mycélien, et la sporulation des champignons *M. laxa* et *M. fructicola*.

La stratégie employée pour cette étude se base sur les données disponibles dans la littérature ainsi que les résultats acquis au cours des années précédentes par le GAFL concernant la corrélation établie entre la résistance à l'infection des fruits par le pathogène et les teneurs en composés d'intérêt. Les données recensées ont permis de choisir les composés de surface les plus pertinents à tester *in vitro* sur *M. laxa* et *M. fructicola*, en tenant compte de leurs caractéristiques biochimiques. Un travail de mise au point de protocoles a été réalisé afin de mener à bien les tests *in vitro* (Figure 3). Les analyses sont effectuées à partir de composés de synthèse purifiés et d'extraits naturels de cires de nectarines.

II - MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

L'étude de l'effet fongicide des composés phénoliques et triterpénoïdes de *P. persica* porte sur deux géotypes de nectarines présents dans la collection de l'INRA d'Avignon : Summergrand (SG) et Zéphir (ZE). Deux stades phénologiques des fruits sont étudiés pour chacun de ces géotypes (Figure 4). Le premier stade d'expansion rapide du péricarpe pendant lequel les fruits sont vulnérables à une infection par *Monilinia* spp. (stade sensible), et le stade intermédiaire correspondant à la lignification de l'endocarpe et durant lequel les fruits sont moins sensibles à une infection (stade résistant) (Chiu et al. 2013).

2. Extraction en masse de cires de nectarines

Les extraits en masse de cires de nectarines sont effectués aux stades sensible (2 à 3 g) et résistant (20 à 30 g). Afin d'obtenir suffisamment d'extraits pour les tests *in vitro*, l'extraction est effectuée à partir d'une centaine de fruits du stade sensible et une quarantaine de fruits du stade résistant. Pour chaque géotype, les fruits sont récoltés, pesés, mesurés (diamètres de la hauteur, la suture, et l'entre-joue de chaque fruit), lavés à l'eau, puis mis à sécher à l'air libre. Les fruits sont plongés pendant 30 secondes dans environ 1 litre de chloroforme afin d'en extraire uniquement les cires. La solution obtenue (extrait de cires) est ensuite filtrée dans un flacon en verre puis conservée à 4°C. La composition biochimique des extraits est vérifiée en HPLC. Pour cela, une aliquote de 10 ml de chaque extrait est prélevée ; le reste sert aux tests *in vitro*.

A : Fruits (SG) au stade sensible

B : Fruits (SG) au stade résistant



Figure 4 : Stades de développement des fruits étudiés

Classe	Groupe	Nom du composé	Abréviation	Souche(s) testée(s)
Composés phénoliques	Flavanol	Catéchine	cat	<i>M. laxa</i>
	Flavanol	Epicatéchine	epicat	<i>M. laxa</i>
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide chlorogénique	a_chloro	<i>M. laxa</i> et <i>M. fructicola</i>
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide caféique	a_cafe	<i>M. laxa</i> et <i>M. fructicola</i>
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide férulique	a_feru	<i>M. laxa</i> et <i>M. fructicola</i>
	Anthocyanine	Cyanidine-3-glucoside	c3glu	<i>M. laxa</i>
	Flanonol	Quercetine-3-glucoside	q3glu	<i>M. laxa</i>
	Flanonol	Quercetine-3-rutinoside	q3rut	<i>M. laxa</i>
Terpénoïdes	Triterpénoïde	Acide oléanolique	a_ole	<i>M. laxa</i>
	Triterpénoïde	Acide maslinique	a_mas	<i>M. laxa</i>
	Triterpénoïde	Acide bétulinique	a_bet	<i>M. laxa</i>

Tableau 1 : Classification, nom, et abréviation des composés de synthèse testés sur *Monilinia* spp.

3. Préparation des extraits de cires pour les tests *in vitro*

Les extraits de cires sont concentrés à sec en utilisant un évaporateur rotatif, puis remis en solution dans un volume de chloroforme calculé pour que la quantité de cires déposées sur la surface du milieu de culture soit proportionnelle à la quantité présente sur la surface totale des fruits extraits (Annexe 1).

4. Analyses biochimiques

Les aliquotes des extraits de cires sont concentrées à sec en utilisant un évaporateur rotatif, puis remises en solution en utilisant 1 ml de méthanol afin d'être analysées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD). Les analyses par HPLC (SHIMADZU - Prominence) sont effectuées en phase inverse en utilisant une colonne de silice C18 (MERCK Superspher RP18endcapped). La phase mobile utilisée possède un débit de 0,7ml/min et se compose de méthanol et d'eau UltraPure à pH 2,6. Le gradient d'éluion est explicité dans l'Annexe 2. Les échantillons sont analysés simultanément aux longueurs d'onde 210 et 315 nm, permettant respectivement une identification des triterpénoïdes et des composés phénoliques. Une fois identifié, chaque composé est quantifié en calculant l'aire du pic généré à l'aide du logiciel LCSolutions. Leur concentration est déterminée par étalonnage externe en utilisant une gamme étalon de composés standards de concentrations connues. Les standards utilisés sont : l'acide ursolique, l'acide oléanolique et l'acide bétulinique (Extrasynthèse), ainsi que l'acide p-coumarique (Sigma-Aldrich) pour ses dérivés. La concentration des composés est exprimée en μg par cm^2 de surface de fruit. Pour les dérivés issus des acides ursolique ou oléanolique (origine et voie de biosynthèse non déterminée), leurs concentrations sont exprimées en équivalent d'acide ursolique ($\mu\text{g eq a}_{\text{urs}}/\text{cm}^2$).

5. Composés phénoliques et triterpénoïdes de synthèse

L'analyse de données d'expériences réalisées entre 2013 et 2017 au GAFL, a permis d'identifier près d'une cinquantaine de composés au niveau de l'épiderme de pêches et nectarines, et de mettre en évidence les composés les plus corrélés aux traits d'infection des fruits par *M. laxa*. Ainsi, 25 composés ont été corrélés significativement aux traits d'infection par le pathogène (Annexe 3). A partir de ces derniers, 8 composés phénoliques et 3 triterpénoïdes ont été choisis pour être analysés individuellement afin de rendre compte de leurs effets vis-à-vis de *M. laxa* et *M. fructicola* (Tableau 1). Ces derniers ont été sélectionnés en vue d'en étudier les effets à travers des tests *in vitro*. Le choix de ces composés s'appuie sur les recherches effectuées au GAFL ainsi que les données disponibles dans la littérature. Les composés étudiés sont naturellement présents en surface des fruits de *P. persica* ou en sont les précurseurs. C'est le cas des acides férulique et caféique qui ne sont pas présents à la surface des fruits, mais qui sont à l'origine de nombreux dérivés présents dans l'épiderme des fruits. De plus, les acides férulique et caféique ont été identifiés comme inhibiteurs de *M. laxa* par Fan Su (2012). Par ailleurs, certains composés ont déjà montrés leur efficacité pour inhiber des pathogènes (Bostock et al. 1999 ; Mikulic Petkovsek et al. 2011 ; Hammerschmidt 2014). Les composés sont également sélectionnés en prenant en compte leur disponibilité dans le commerce ; ils ont été achetés sous forme de poudre à différents fournisseurs (Annexe 4).

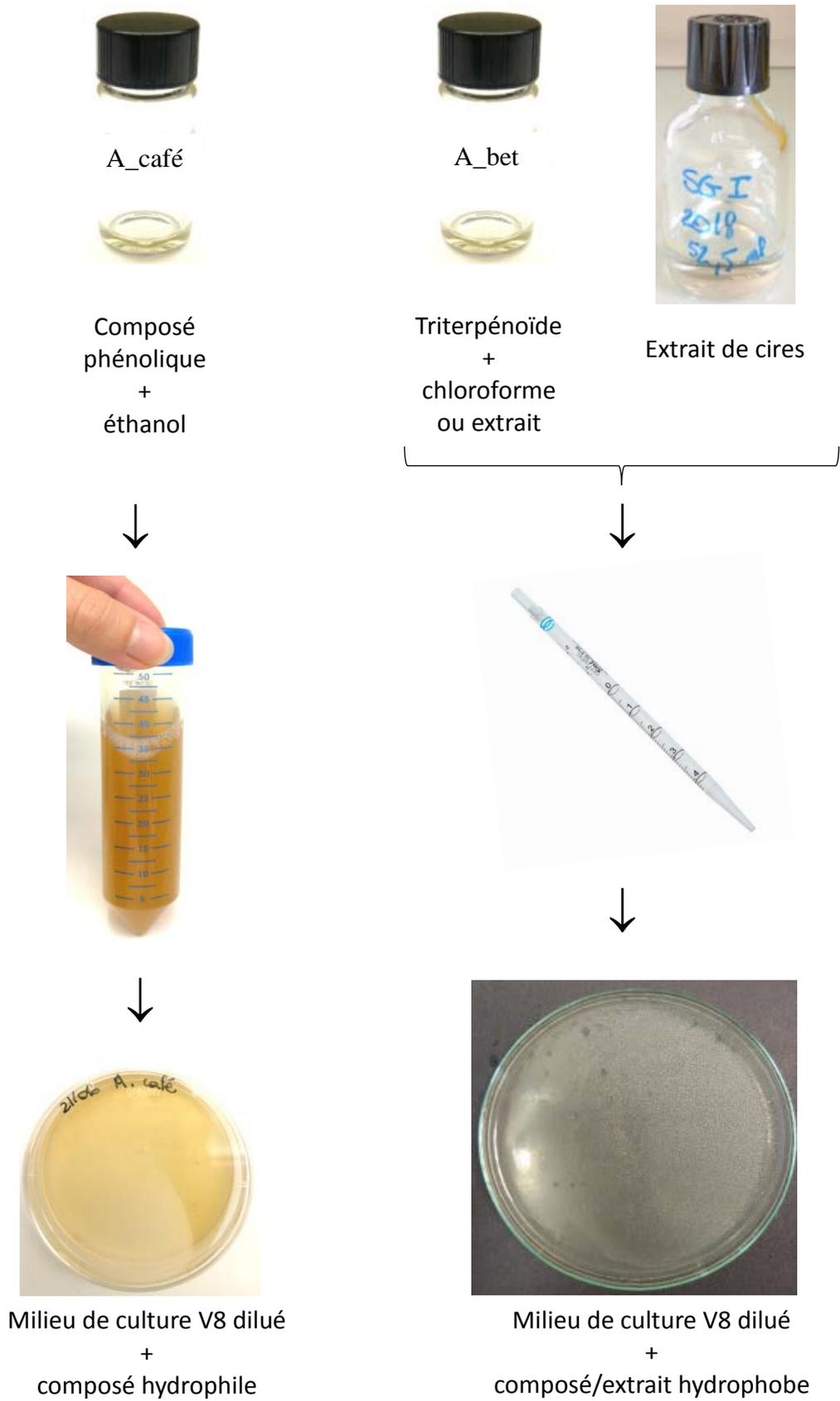


Figure 5 : Représentation schématique des étapes permettant de réaliser les milieux de cultures des tests in vitro

6. Préparation des milieux de culture pour les tests *in vitro*

Les tests de différents milieux de culture inoculés avec une suspension de spores de *M. laxa* a permis de retenir le milieu V8 dilué (Annexe 5) afin de suivre au mieux l'évolution de la croissance du champignon. Les tests de cinétique de croissance mycélienne et de taux de germination sont effectués avec ce milieu.

Une étude préliminaire menée au GAFL a montré que la catéchine et l'épicatéchine ont un effet sur le développement de *M. laxa* sur pétales de fleurs à partir d'une concentration de 2 mM (Fan Su 2012). Cette concentration de 2 mM correspond aux concentrations réelles de ces composés mesurées dans l'épiderme de fruits. De façon à réaliser les tests *in vitro* dans des conditions se rapprochant de celles en surface de fruits et de pouvoir comparer les effets des composés sur le pathogène à concentration équivalente, les tests *in vitro* ont été réalisés à 2 mM pour tous les composés étudiés. Les quantités utilisées pour réaliser les milieux de culture contenant les composés à une concentration de 2 mM sont explicitées dans l'Annexe 6. En fonction de la nature des composés (solubilité dans l'eau), la mise en place des tests *in vitro* diffère légèrement. On distingue en effet le protocole pour les composés phénoliques de celui des triterpénoïdes et extraits de cires (Figure 5).

Les composés phénoliques sont hydrophiles et peuvent donc facilement être incorporés dans un milieu de culture. Ces composés de synthèse, qui sont initialement sous forme de poudre, sont préalablement solubilisés dans de l'éthanol (solvant polaire). Cette solution est ensuite incorporée dans du milieu de culture V8 dilué liquide de sorte à ce que la concentration du composé dans le milieu soit de 2 mM. 5 ml de ce milieu sont ensuite coulés dans des boîtes de Pétri (50 mm de diamètre). On obtient un milieu de culture gélosé en quelques minutes. Les triterpénoïdes, qui sont hydrophobes, ne peuvent donc pas être incorporés dans un milieu de culture. Ils sont ainsi solubilisés dans du chloroforme (solvant organique polaire) avant d'être déposés sur le milieu. Compte tenu de la présence de triterpénoïdes dans les extraits de cires, ces derniers sont également solubilisés dans du chloroforme. Le processus des tests *in vitro* pour les triterpénoïdes de synthèse et les extraits de cires sont donc similaires. 9 ml de milieu V8 dilué sont déposés dans des boîtes en verre (90 mm de diamètre). Lorsque le milieu de culture est solide, 3ml de la solution contenant le composé ou l'extrait de cires y sont déposés de sorte à être équitablement répartis sur toute la surface de la gélose. Une fois le chloroforme évaporé, le composé ou l'extrait de cires présent sur le milieu de culture forme un film. Pour chaque protocole, la modalité 'témoin' est réalisée avec le milieu de culture V8 dilué et le solvant correspondant.

7. Matériel fongique et conditions de croissance

Les souches de *M. laxa* (ML3) et *M. fructicola* (FAN12) étudiées ont respectivement été obtenues à partir d'un abricot momifié et d'un rameau d'abricotier, naturellement infectés. Ces deux souches proviennent d'une des parcelles expérimentales de l'INRA de Gotheron. Elles sont conservées en maintenant des aliquotes de suspensions de spores de concentration 10^5 spores.ml⁻¹ à -20°C dans un tampon phosphate contenant 20% de glycérol.

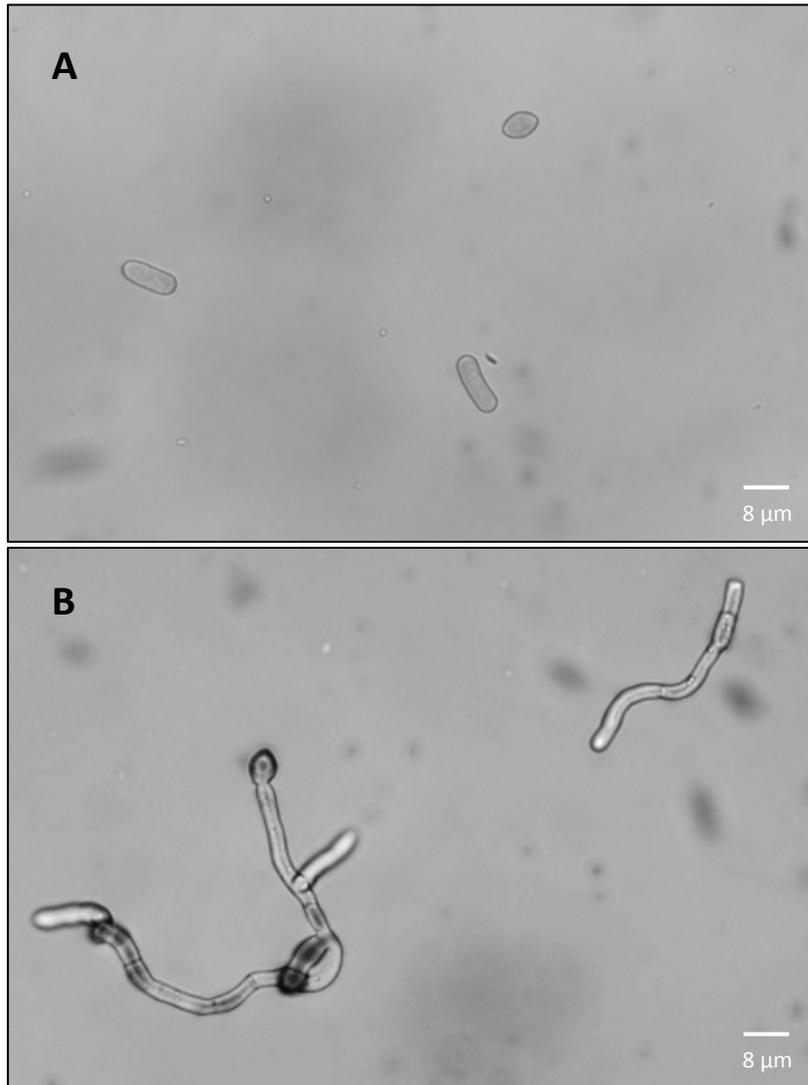


Figure 6 : Photographie de spores non germées (A) et de spores germées à 24 heures post-inoculation (B)

Les souches sont multipliées dans des boîtes de Pétri ou sur fruits mûrs. Une goutte de 10 µl d'une suspension de spores de concentration 10^5 spores.ml⁻¹ est déposée sur le milieu V8 dans des boîtes de Pétri de 90 mm, ou sur les fruits blessés préalablement désinfectés (40 secondes dans un bain d'eau à 55°C). Les boîtes sont mises à incuber dans une étuve tandis que les fruits inoculés sont maintenus dans une chambre de culture. Afin de favoriser le développement des champignons en vue de produire du mycélium et des spores, la température est fixée à 24°C avec une photopériode de 12 heures de jour. Après plusieurs jours d'incubation (environ 7 jours pour les fruits blessés et 15 jours pour les milieux de culture), les spores produites sont mises en suspension afin de procéder aux tests *in vitro*.

8. Tests *in vitro*

Les tests suivants ont été réalisés à partir d'une suspension de spores de concentration 10^5 spores.ml⁻¹ issue de colonies de *M. laxa* (cultivées sur milieu V8 dilué ou sur fruits murs) et de *M. fructicola* (cultivées sur milieu V8 dilué). Les milieux inoculés sont mis à incuber dans l'étuve pour favoriser le développement du champignon (température de 24°C et photopériode de 12 heures de jour).

a. Taux de germination des spores

Le taux de germination des spores de la souche de *M. laxa* est évalué à partir d'une suspension de spores de concentration 10^5 spores.ml⁻¹. 100 µl de cette suspension sont étalés sur le milieu de culture contenant le composé de synthèse. Les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve pendant 24 heures avant de dénombrer les spores ayant germé ou non (Figure 6). Le dénombrement s'effectue par observation directe de la surface de la boîte sous microscope. Une centaine de spores est observée, et de là on détermine le pourcentage de spores germées. Trois tests de germination ont été réalisés à des dates différentes pour chaque composé étudié.

b. Cinétique de croissance mycélienne

10 µl d'une suspension de spores de concentration 10^5 spores.ml⁻¹ sont déposés au centre du milieu de culture gélosé contenant le composé ou l'extrait de cires. Les mesures de croissance mycélienne de la colonie de champignon sont réalisées à 72, 96, 120, 144 et 168 heures post-inoculation. Pour cela, le diamètre maximal de la colonie est mesuré ainsi que le diamètre perpendiculaire. Deux à quatre tests de cinétique de croissance sont réalisés pour chacun des composés (en fonction de la quantité initiale de composé disponible) à des dates différentes. Chaque test comprend 3 répétitions.

c. Sporulation

Une fois les mesures de croissance du mycélium achevées, la sporulation du champignon est évaluée afin de déterminer l'effet des composés sur la production de spores. Pour cela, une suspension de spores est réalisée entre 10 à 12 jours post-inoculation

à partir des colonies s'étant développées au contact d'un composé ou d'extrait de cires. Les spores sont dénombrées à l'aide d'un hématimètre afin d'obtenir la quantité de spores.ml⁻¹.

d. Capacité germinative de la nouvelle génération de spores

A partir du dénombrement précédent, une suspension de spores de concentration 10⁵ spores.ml⁻¹ est réalisée. 100 µl de celle-ci sont étalés sur un milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA) afin d'évaluer la germination de la nouvelle génération de spores. Le dénombrement des spores germées et non germées a lieu 24 heures après incubation dans l'étuve, et s'effectue en suivant le même processus que pour le taux de germination.

9. Analyses statistiques

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

```
ResMM<-lmer(DiametreColonie ~ DateManip*HeureObs*Composé + (1|NumBoite), data=a)
anova(ResMM)
```

Les variables utilisées sont :

- DiametreColonie ; correspondant au diamètre moyen d'une colonie de *Monilinia*
- DateManip ; correspondant à la date à laquelle a eu lieu le test *in vitro*
- HeureObs ; correspondant à l'heure post-inoculation à laquelle la mesure du diamètre de la colonie a été effectuée
- Composé ; correspondant au nom du composé de synthèse ou extrait de cires utilisé pour le test *in vitro*
- NumBoite ; correspondant au numéro de répétition de la boîte de Pétri ou boîte en verre pour chaque test *in vitro*

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

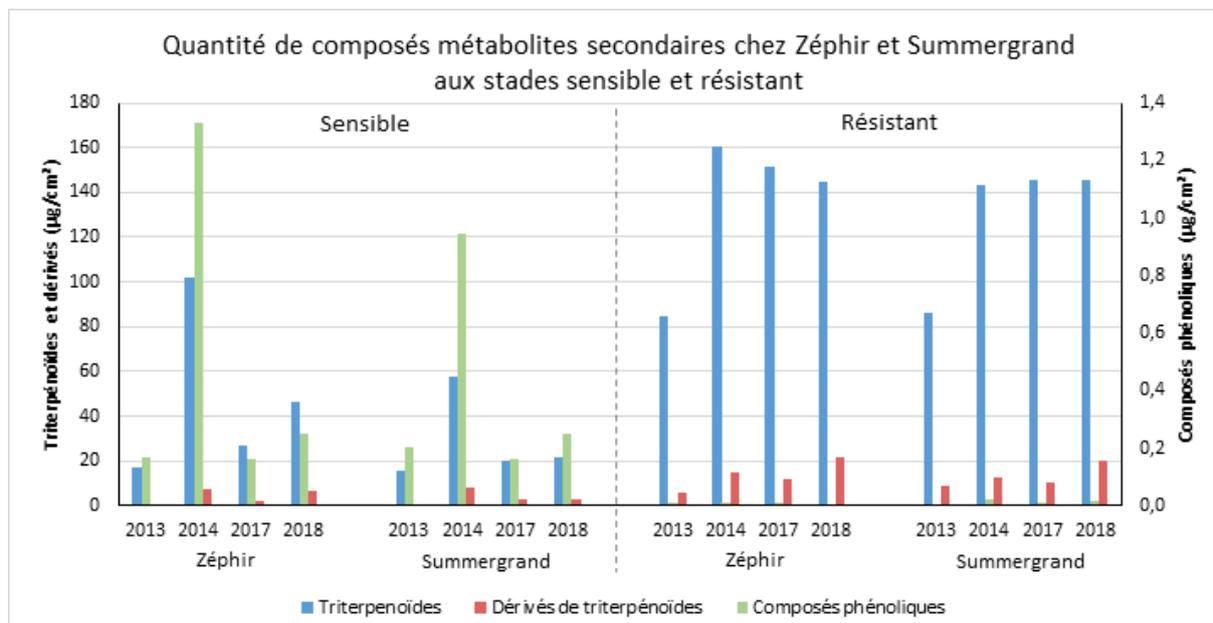


Figure 7 : Composition en métabolites secondaires d'extraits de cires de Zéphir et Summergrand aux stades sensible et résistant

III - RESULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des composés phénoliques et triterpénoïdes

Pour chacun des stades sensible et résistant de Zéphir et Summergrand, l'analyse par HPLC-DAD a permis d'identifier et de quantifier les composés présents dans les cires de fruits prélevés au cours de 4 années. Un exemple de chromatogramme obtenu pour l'année 2018 est détaillé en Annexe 7. D'autres constituants de cires ont pu être identifiés par GC-MS chez Zéphir et Summergrand, tels que des alcanes, des acides gras, des alcools gras, des aldéhydes gras ou encore des phytostérols, mais ces derniers ne font pas l'objet de cette étude.

Parmi les composés phénoliques présents dans les cires, 3 formes de p-coumaroyldihexosidepentaacetyl (pcdhpa) ont pu être identifiées et quantifiées. Il en est de même pour 6 triterpénoïdes : acide oléanolique, acide ursolique, 2 formes d'acide trihydroxy-urs-12-en-28-oic (thu), acide maslinique et acide corosolique. Plusieurs dérivés de triterpénoïdes ont également été déterminés : 10 formes d'acide p-coumaroyl-dihydroxy-urs-12-en-28-oic (cdhu) et 4 formes d'acide 3 β -p-coumaroyloxy-urs-12-en-28-oic (cou) (Annexe 8). La figure 7 illustre les différences de composition en métabolites secondaires d'extraits de cires de pêche observées entre les deux stades étudiés.

La quantification des composés présents au sein des extraits des génotypes Zéphir et Summergrand à deux stades de développement montre la différence de composition au cours de l'ontogenèse du fruit. Les quantités de composés phénoliques au stade sensible (fruit très jeune) sont plus importantes qu'au stade résistant (fruit en croissance) quels que soient l'année ou le génotype, et inversement pour ce qui est des triterpénoïdes et leurs dérivés. Cela coïncide avec les résultats obtenus sur la tomate par España et al. (2014) qui observent une diminution de la quantité de composés phénoliques au cours de la croissance, puis une augmentation significative de ces derniers pendant la maturation des fruits. C'est lorsque le fruit est très jeune ou mûr que ce dernier est le plus sensible à son environnement. C'est également à ces stades que le fruit possède peu de cires, et par conséquent peu de triterpénoïdes. Au cours de sa croissance, les teneurs en cires et en triterpénoïdes augmentent, ce qui procure au fruit une meilleure résistance à tous types de stress. Cela rejoint les résultats obtenus sur les baies de raisin (*Vitis vinifera*) par Pensec et al. (2014) qui montrent une accumulation de cires ainsi qu'une augmentation de triterpénoïdes à la surface de baies de 8 variétés différentes au cours de leur développement (du stade jeune fruit au stade véraison). De telles observations ont été faites chez plusieurs génotypes de *P. persica*, pour lesquels les teneurs en triterpénoïdes quantifiées à différents stades de développement apparaissent négativement corrélées à l'infection par *Monilinia* (rapport de stage Yé Yang 2012). Cependant, la formation de la cuticule ralentit ou cesse au cours du développement du fruit, une fois la maturation enclenchée, et souvent avant que le fruit n'ait atteint sa taille définitive. S'en suit alors une dilution des cires et triterpénoïdes qui diminuent par unité de surface chez les fruits matures (España et al. 2014 ; Lara et al. 2015). Ainsi, la résistance accrue du fruit à des stress biotiques et abiotiques pourrait être en partie liée à la présence de certains composés, notamment les acides ursolique et oléanolique. En effet, ces derniers sont les composés majoritaires des cires (Jetter and Schaffer 2001 ; Belge et al. 2014a ; Belge et al. 2014b), et sont présents dans les cires de pomme, poire, pêche, prune, raisin, cerise, olive ou encore myrtille (Lara et al. 2015 ; Lv et al. 2016 ; Chu et al.

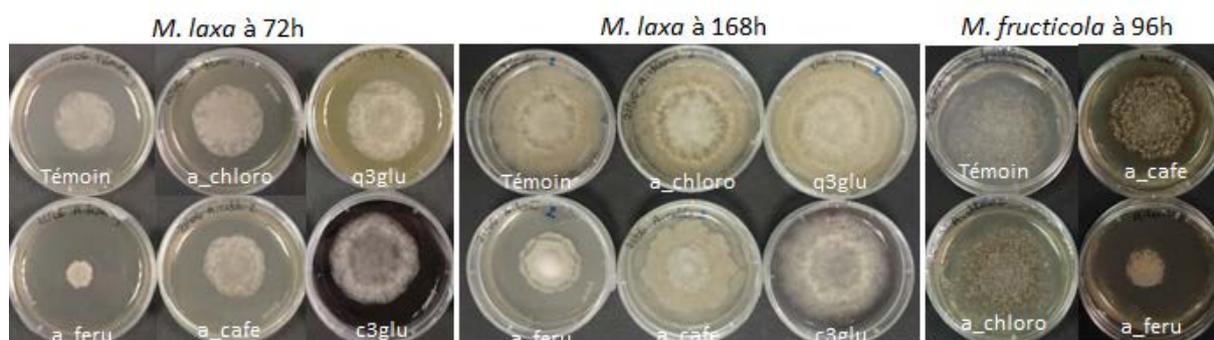


Figure 8 : Croissance de *M. laxa* et *M. fructicola* exposés à différents composés de synthèse

A p-value pour <i>M. laxa</i>	a_cafe	a_chloro	a_feru	c3glu	cat	epicat	q3glu	q3rut
DateManip	0.0003995 ***	0.8049	0.2888056	0.180112	0.000626 ***	0.833087	0.6708914	6.492e-06 ***
HeureObs	< 2.2e-16 ***							
Composé	0.0198054 *	9.983e-09 ***	5.185e-06 ***	8.117e-08 ***	0.0165854 *	0.021068 *	4.061e-06 ***	0.0001073 ***
DateManip:HeureObs	0.2354259	0.9848	0.0045051 **	0.435504	0.2532512	0.986958	0.7092600	0.1148131
DateManip:Composé	0.4112716	0.4392	0.0002037 ***	4.546e-05 ***	0.7546385	0.710280	0.9339729	0.0349376 *
HeureObs:Composé	0.000213 ***	2.207e-05 ***	1.354e-11 ***	6.863e-06 ***	0.04864 *	0.006825 **	0.0009114 ***	0.003372 **
DateManip:HeureObs:Composé	0.4562840	0.5501	0.0072860 **	0.006536 **	0.1520974	0.669335	0.9313891	0.0170241 *

B p-value pour <i>M. laxa</i>	a_bet	a_mas	a_ole	SG2017I	SG2017II	SG2018I	SG2018II	ZE2013I	ZE2013II
DateManip	2.596e-05 ***	0.4030	2.118e-12 ***	0.986162	0.81452	0.9916	0.28475	0.0040359 **	5.178e-06 ***
HeureObs	< 2.2e-16 ***	< 2.2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***	< 2e-16 ***
Composé	0.2806	0.8711	0.05246 .	0.014712 *	0.25581	0.2207	0.47033	0.3391720	0.09944 .
DateManip:HeureObs	2.491e-12 ***	6.243e-05 ***	< 2.2e-16 ***	0.948106	0.84915	0.4312	0.17415	9.181e-10 ***	6.431e-15 ***
DateManip:Composé	0.4608	0.9384	0.50852	0.426867	0.34128	0.3658	0.10500	0.0204474 *	0.42278
HeureObs:Composé	0.7987	0.1522	0.02908 *	0.000529 ***	0.04185 *	1.176e-06 ***	0.03343 *	0.0060025 **	0.85387
DateManip:HeureObs:Composé	0.4613	0.7940	0.74431	0.352609	0.35546	0.1191	0.09814 .	0.0007173 ***	0.25698

. : p-value < 0.1 * : p-value < 0.05 ** : p-value < 0.01 *** : p-value < 0.001

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des effets significatifs (p-value < 0.01) des différents composés phénoliques (A), triterpénoïdes (B) et extraits de cires (B) sur la croissance mycélienne de *M. laxa*

2017). Qui plus est, ils sont présents en grande quantité chez les pêches au stade résistant (de 60 à 100 jours après floraison environ, Annexe 9) et chez les variétés tolérantes au phénomène de craquelure (Rios et al. 2015).

2. Tests *in vitro*

La figure 8 illustre la croissance de *M. laxa* et *M. fructicola* au contact de composés de synthèse à différentes heures post-inoculation. Visuellement, des dissemblances sont apparentes entre une colonie témoin et une colonie cultivée au contact d'un composé, notamment au niveau de la forme de la colonie, la densité ou encore la couleur du mycélium. Par exemple, la coloration brune du mycélium est due à la production de mélanine. La synthèse de ce pigment par les microorganismes, est souvent associée à leur virulence puisque la mélanisation des appressoriums du champignon, qui assurent une pénétration de la surface de l'hôte, est nécessaire au développement de champignons pathogènes, tels que *Venturia inaequalis*, *Pyricularia oryzae*, ou encore *Colletotrichum lagenarium* (Lee and Dean 1993 ; Butler and Day 1998). Un défaut de mélanisation se traduit par une coloration blanche du mycélium, observable lorsque de l'acide férulique ou de la cyanidine-3-glucoside est ajouté au milieu de culture de *M. laxa*. Dans ce cas, il semblerait que ces molécules inhibent la production de mélanine et pourraient donc empêcher la pénétration du champignon dans le fruit, limitant ainsi le développement de la maladie *in vivo* (De Cal et Melgarejo 1994). Villarino et al. (2011) rapportent que l'acide chlorogénique et l'acide caféique inhibent l'infection de pêches immatures par *M. laxa* en interférant avec la production de mélanine et non pas avec la croissance du pathogène. Cependant, dans notre étude, les acides chlorogénique et caféique ne semblent pas avoir cet effet sur *M. laxa* ou *M. fructicola*.

a. Cinétiques de croissance de *M. laxa*

Les cinétiques de croissance mycélienne de *M. laxa* sont étudiées à partir de deux types de spores (provenant de champignons cultivés sur milieu de culture ou sur fruits mûrs). Les analyses statistiques (régression linéaire à effets mixtes) effectuées à partir des modalités 'témoin' montrent que le type de spores n'influence pas significativement le développement du champignon. Par contre des différences significatives de croissance ont été observées, pour *M. laxa*, en fonction de la date à laquelle a eu lieu l'expérience (Annexe 10). Chaque test ayant été effectué dans les mêmes conditions, des facteurs non contrôlés et non identifiés semblent jouer un rôle sur le développement du champignon. Le facteur 'heure d'observation' montre un effet très significatif qui indique qu'au fil des heures la colonie grandit nettement. A cause de l'effet 'date' sur les modalités 'témoin', chaque composé et extrait de cires est comparé à la modalité 'témoin' de la même date (Annexe 11 ; la modalité 'témoin' est représentée en gris).

Les analyses statistiques ont montré que pour l'ensemble des composés phénoliques, triterpénoïdes et extraits de cires étudiés, l'effet fixe 'spore' n'est pas significatif. En revanche, l'effet fixe 'date' est significatif pour 7 d'entre eux (Tableau 2) sur 17, ce qui signifie que le composé agit différemment sur le champignon d'une expérience à l'autre. Le

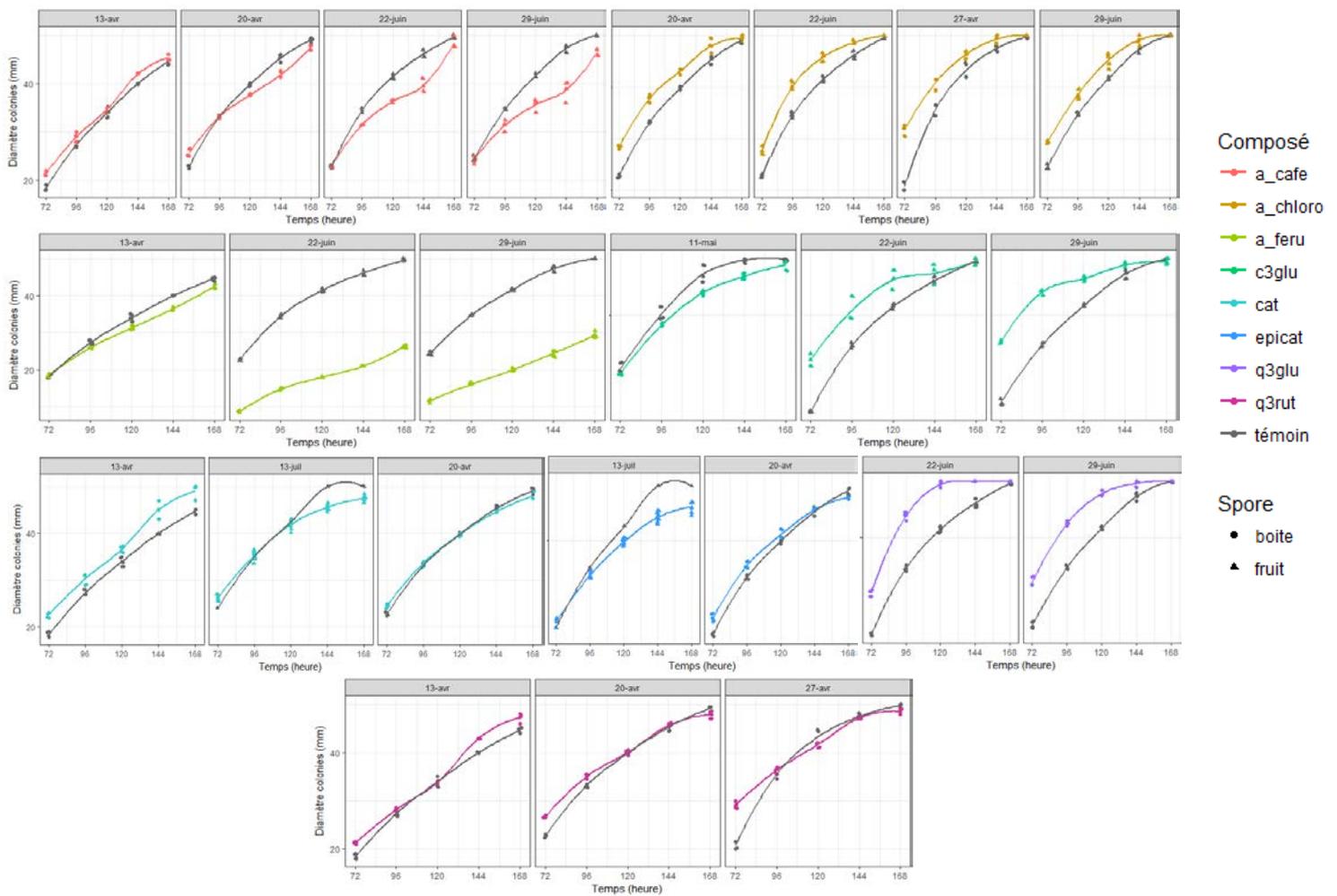


Figure 9 : Cinétique de croissance de *M. laxa* cultivé sur milieu contenant des composés phénoliques

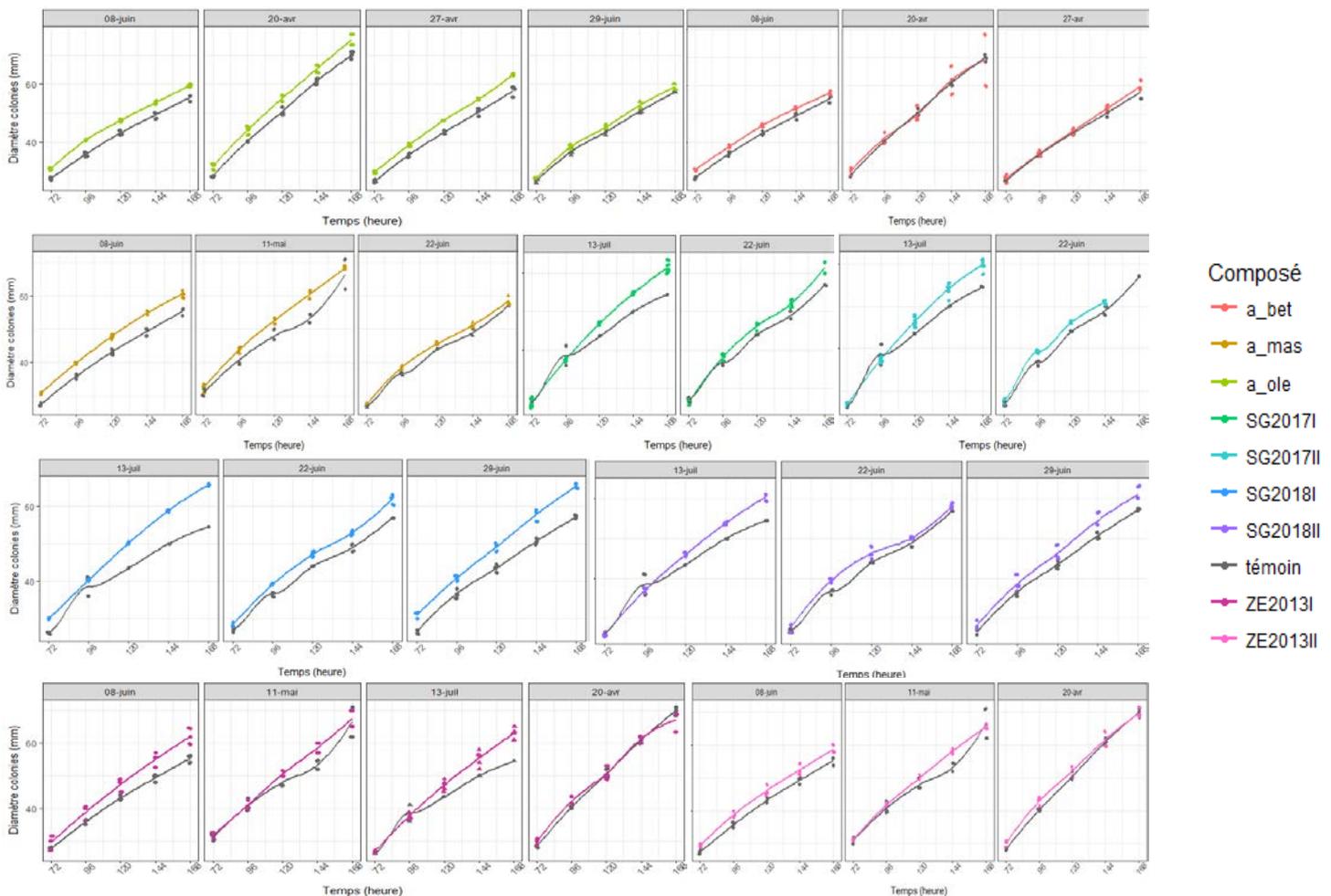


Figure 10 : Cinétique de croissance de *M. laxa* cultivé sur milieu contenant des triterpénoïdes ou extraits de cires

paramètre 'heure d'observation' indique un effet très significatif pour tous les composés et extraits de cires, montrant que le développement de la colonie est clairement marqué au cours du temps. Les analyses mettent également en évidence que pour 10 composés et extraits étudiés, la croissance de *M. laxa* est significativement influencée puisque l'évolution du diamètre de la colonie au cours du temps dépend du composé (interaction HeureObs:Composé). Notons que dans certains cas, pour les tests effectués avec les composés phénoliques, la cinétique de croissance du champignon atteint un plateau à 50 mm car le champignon a colonisé l'ensemble de la boîte de Pétri.

Des composés inhibiteurs

Les figures 9 et 10 illustrent les allures des cinétiques de croissance de *M. laxa* au contact des différents composés et extraits de cires.

Pour l'**acide caféique**, il y a une forte interaction 'HeureObs:Composé', ce qui montre que l'effet du composé sur le champignon est significatif mais dépend de l'heure d'observation. Les graphiques montrent que l'acide caféique a tendance à inhiber le développement de *M. laxa* entre 96 et 144 heures post-inoculation.

L'**acide férulique** montre une interaction significative de toutes les variables étudiées (DateManip:HeureObs:Composé), et un effet encore plus prononcé pour l'interaction du composé et de l'heure d'observation. Le développement mycélien est ralenti tout au long de l'expérience en présence d'acide férulique dans le milieu, révélant ainsi l'effet inhibiteur de ce composé. Par ailleurs, une différence de croissance est notée selon le type de spores utilisé. En effet, les spores prélevées sur des fruits semblent être plus sensibles à l'effet du composé car le développement des colonies issues de ces spores semble davantage inhibé. Cependant il n'est pas possible de définir clairement s'il s'agit de l'effet 'spore' ou de l'effet 'date' (dont l'interaction 'DateManip:Composé' est élevée) puisque ces tests ont été réalisés avec des spores différentes et à des dates différentes. Il faudrait tester les deux types de spores lors d'une même expérience pour déterminer l'effet de ces variables sur le champignon.

Des composés et extraits activateurs

L'**acide chlorogénique** ne présente pas d'effet fixe significatif en ce qui concerne la date de l'expérience, soulignant la régularité de l'action de ce composé sur le développement du champignon. Cependant la très forte interaction entre le composé et l'heure d'observation montre que l'effet de l'acide chlorogénique dépend beaucoup du temps. Ce composé a un effet positif sur le champignon car il favorise son développement mycélien de 72 à 144 heures post-inoculation. Un important décalage entre les 2 cinétiques est observé au démarrage puis s'estompe en fin de cinétique. Cependant, ceci est sans doute un artéfact dû à la taille de la boîte de Pétri utilisée pour l'expérimentation. En effet, la croissance du champignon ralentie lorsque la colonie s'approche des bords de la boîte.

Un profil similaire est constaté pour la **quercétine-3-glucoside** puisque l'effet 'composé' dépend de façon significative de l'heure d'observation, et le diamètre de la colonie en présence de ce composé est nettement supérieur à celui de la modalité 'témoin' de 72 à 144 heures post-inoculation.

La croissance de *M. laxa* est augmentée à certaines heures lorsqu'il est cultivé sur un milieu de culture contenant des **extraits de cires de fruits sensibles** (SG2017I, SG2018I, ZE2013I) puisqu'il y a un effet significatif de l'interaction 'HeureObs:Composé'. En fonction de l'heure d'observation, les extraits ont plus ou moins d'effet sur la croissance du champignon. Pour les extraits SG2017I et SG2018I, le développement mycélien est favorisé de 120 à 168 heures post-inoculation. Cependant, la forte variabilité de l'effet 'date' pour l'extrait ZE2013I ne permet pas de déterminer à quel moment le composé agit le mieux sur *M. laxa*, on ne peut que constater que cet extrait a tendance à promouvoir la croissance du champignon. Le développement mycélien du champignon est donc favorisé au contact de ces extraits. La composition des cires à ce stade de développement des fruits ne permet donc pas de prévenir l'apparition de la pourriture brune, confirmant les résultats obtenus précédemment (Yé Yang 2012).

Enfin, les résultats acquis avec la **quercétine-3-rutinoside** montrent un effet significatif dépendant de l'heure d'observation : ce composé agit comme un activateur en début de cinétique (différence de diamètre entre les deux modalités à 72 heures post-inoculation) puis cet effet disparaît.

Des composés et extraits aux effets instables et peu importants

Pour la **cyanidine-3-glucoside**, les interactions comprenant le facteur 'Composé' sont significatives. Cependant la cinétique de croissance varie selon la date et/ou le type de spores, puisque dans un cas la cyanidine-3-glucoside inhibe le développement du champignon en fin d'expérience, tandis que dans les deux autres cas, ce composé contribue à une croissance plus rapide en début d'expérience. De même que pour l'acide férulique, il n'est pas possible de dire si cette différence est due à l'effet 'spore' ou à l'effet 'date'.

Pour ce qui est de l'**épicatéchine**, la seule interaction significative montre que l'effet du composé sur la croissance du champignon dépend de l'heure d'observation. Cependant le rôle de l'épicatéchine sur le développement mycélien du champignon n'est pas défini puisque les cinétiques diffèrent d'un test à l'autre. Dans ce cas, il n'y a pas d'effet 'date' significatif, mais la différence de croissance entre les tests pourrait provenir du type de spores.

Des composés et extraits sans effet significatif sur la croissance mycélienne

Les résultats obtenus pour la **catéchine** ne montrent aucun effet significatif intéressant de ce composé vis-à-vis de la croissance du champignon. Il en est de même concernant l'**acide bétulinique**, l'**acide maslinique**, l'**acide oléanolique**, ainsi que les **extraits de cires de fruits résistants** (SG2017II, SG2018II, ZE2013II). Hormis un effet significatif de la date, de l'heure d'observation, et/ou de l'interaction de ces deux effets, le développement du champignon n'est pas significativement influencé pour ces composés et extraits.). Contrairement à ce qui est attendu, les extraits de cires issus de fruits résistants n'inhibent pas le développement mycélien puisque l'évolution du diamètre des colonies est semblable à celle de la modalité 'témoin'. Malgré les quantités importantes en triterpénoïdes à ce stade, les extraits de cires ne limitent pas la croissance du champignon.

p-value pour <i>M. fructicola</i>	a_cafe	a_chloro	a_feru
HeureObs	5.669e-16 ***	1.97e-10 ***	< 2.2e-16 ***
Composé	0.004132 **	0.8049	7.386e-12 ***
HeureObs:Composé	0.029473 *	0.8420	0.05523 .

. : p-value < 0.1

* : p-value < 0.05

** : p-value < 0.01

*** : p-value < 0.001

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets significatifs (p-value < 0.01) des différents composés de synthèse sur la croissance mycélienne de *M. fructicola*

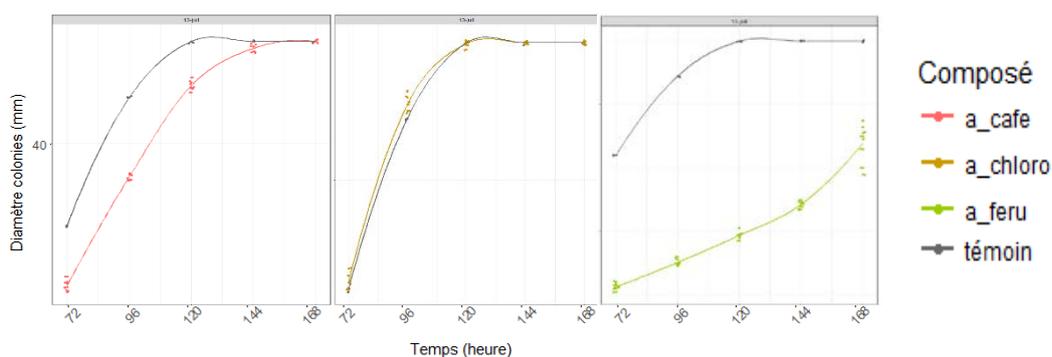


Figure 11 : Cinétique de croissance de *M. fructicola* cultivé sur milieu contenant des composés phénoliques

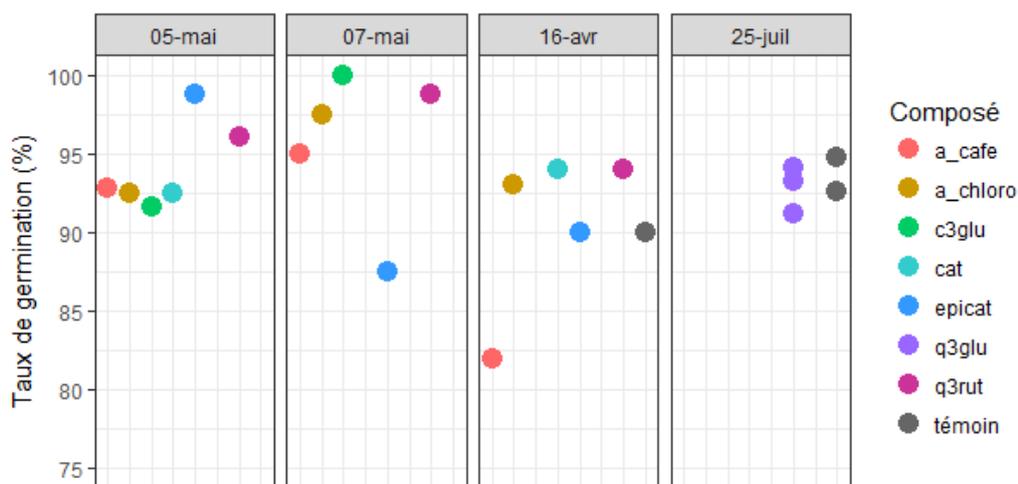


Figure 12 : Taux de germination (%) de spores de *M. laxa* mis à germer sur milieu contenant des composés phénoliques

b. Cinétique de croissance de *M. fructicola*

Pour chacun des 3 composés phénoliques étudiés sur *M. fructicola*, l'effet du composé ne dépend pas significativement de l'heure d'observation (Tableau 3). Cependant, il y a un effet fixe significatif de la variable 'composé' pour les **acides caféique et férulique**, et un effet fixe encore plus significatif de la variable 'heure d'observation' pour l'ensemble des composés. Les graphiques de la figure 11 illustrent bien que l'**acide chlorogénique** n'influence pas la croissance du champignon au cours du temps, tandis que l'acide férulique inhibe nettement le développement mycélien de *M. fructicola* tout au long de l'expérience. C'est aussi le cas pour l'acide caféique, mais la différence de croissance n'est constatée que jusqu'à 120 heures post-inoculation car à partir de là le champignon a colonisé toute la surface de la boîte pour la modalité 'témoin', ce qui explique que les courbes se rejoignent. Les effets des acides férulique et caféique sur les cinétiques de croissance de *M. laxa* et *M. fructicola* sont comparables.

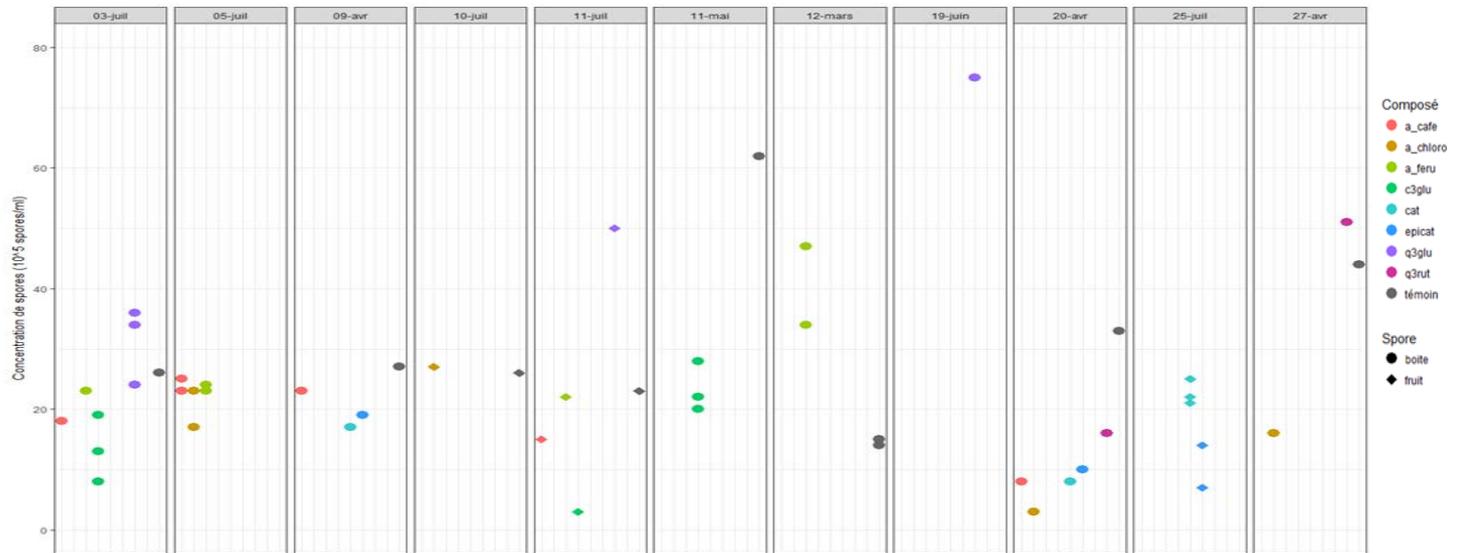
c. Taux de germination des spores de *M. laxa*

Les résultats obtenus (Figure 12) révèlent qu'il y a une variabilité importante en fonction de la date de l'expérience pour un même composé. De ce fait, chaque date doit être traitée séparément des autres. Ainsi, au lieu d'analyser 3 répétitions par composé en combinant toutes les expériences, on ne dispose que d'une répétition par date. Or une donnée unique ne permet pas de conclure en s'appuyant sur une analyse statistique. Il aurait fallu déterminer le taux de germination pour la modalité 'témoin' à chaque date de façon à calculer un effet relatif 'composé-témoin' par date et grouper les résultats des différentes dates. Ceci n'avait pas été anticipé. Par manque de composés disponibles, cette expérience n'a pu être reconduite.

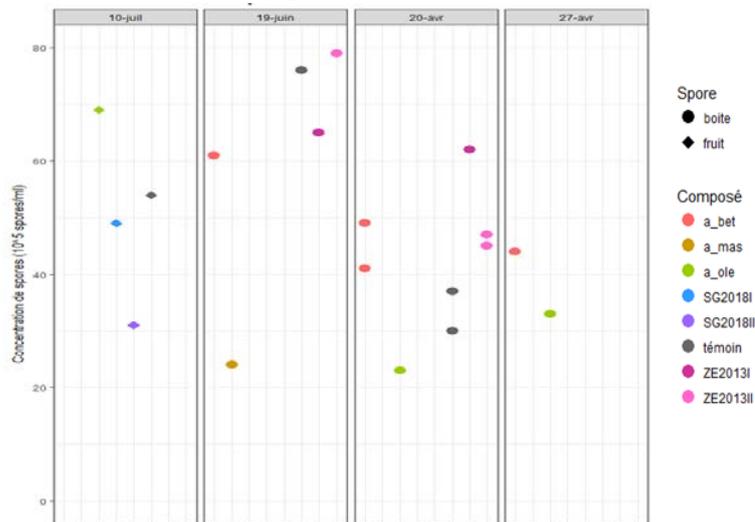
d. Sporulation de *M. laxa* et *M. fructicola*

Ici, l'effet 'type de spores' n'a pas d'influence sur le paramètre étudié puisque la sporulation ne diffère pas significativement selon qu'il s'agisse de spores provenant de boîte de Pétri ou de fruits pour *M. laxa*. En revanche, de même que pour le taux de germination, l'effet 'date' n'est pas négligeable : la variabilité des résultats est importante pour un même composé et surtout pour les modalités témoin, aussi bien pour *M. laxa* que pour *M. fructicola* (Figure 13). Prises indépendamment, les expériences ne disposent pas d'un nombre suffisant de répétitions pour pouvoir être analysées statistiquement. On ne peut donc que supposer l'effet de certains composés sur la sporulation de *M. laxa*. Il semblerait que l'acide caféique, l'acide chlorogénique et la cyanidine-3-glucoside diminuent la concentration de spores produites par le champignon, contrairement à la quercétine-3-glucoside qui serait susceptible de favoriser la production de spores. Pour vérifier ces hypothèses, d'autres expériences doivent être menées en ajoutant une modalité 'témoin' à chaque date et multipliant le nombre de dates d'expérimentations.

A Concentration de spores de *M. laxa*



B Concentration de spores de *M. laxa*



C Concentration de spores de *M. fructicola*

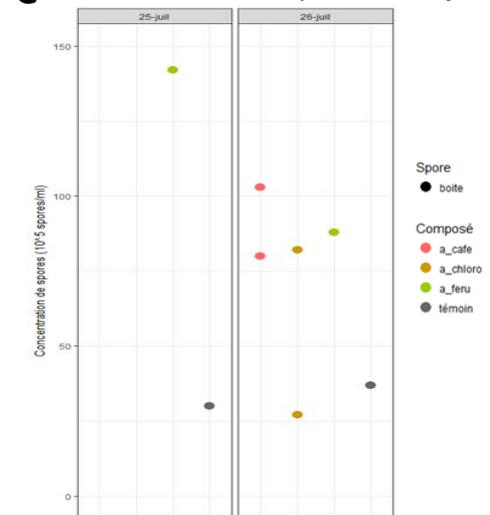


Figure 13 : Concentration de spores ($10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$) de *M. laxa* (A et B) ou *M. fructicola* (C) cultivé sur milieu contenant des composés phénoliques (A et C), triterpénoïdes (B) ou extraits de cires (B)

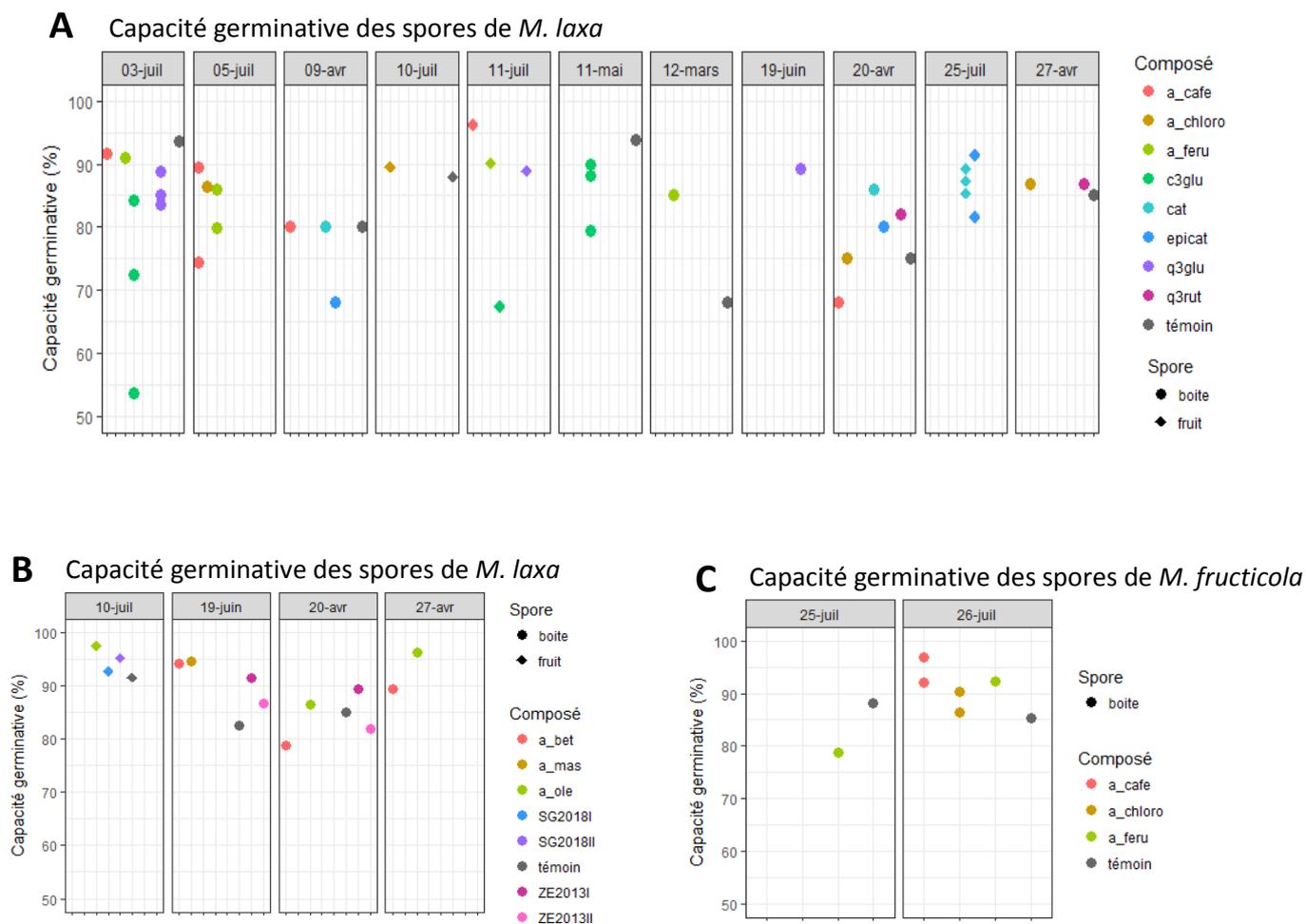


Figure 14 : Capacité germinative (%) de spores de *M. laxa* (A et B) ou *M. fructicola* (C) mises à germer sur milieu contenant des composés phénoliques (A et C), triterpénoïdes (B) ou extraits de cires (B)

e. Capacité germinative de *M. laxa* et *M. fructicola*

Le type de spores utilisé n'a pas d'effet significatif sur la capacité germinative des spores issues de la génération suivante de *M. laxa*. Cependant, l'effet 'date' ne permet pas de réaliser des analyses statistiques dues à la forte variabilité qui existe d'une date à l'autre, aussi bien pour *M. laxa* que pour *M. fructicola* (Figure 14). Cette expérience devra donc être reconduite afin de déterminer si une des modalités testées influence significativement la germination des spores produites par *Monilinia* ayant été en contact avec un composé de synthèse ou un extrait naturel de cires.

IV - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but de cette étude était de mettre au point un protocole permettant d'analyser l'effet de métabolites secondaires vis-à-vis d'un champignon causant des pertes de production énormes de pêches et nectarines.

Dans un premier temps, l'étude biochimique réalisée sur plusieurs échantillons de cires de *P. persica* a permis de quantifier les métabolites secondaires à différents stades de développement du fruit. Ces analyses ont confirmé que davantage de triterpénoïdes et moins de composés phénoliques sont présents dans les cires des fruits résistants.

Parallèlement, la mise au point de protocoles a permis de définir certains éléments essentiels à la réalisation de ce projet : la composition idéale du milieu de culture pour suivre la croissance mycélienne du champignon (de sorte à ce qu'elle ne soit ni trop rapide, ni trop lente), la meilleure façon de solubiliser les poudres de composés de synthèse (solvant et quantité de solvant compatibles) et de les incorporer ou les répartir dans/sur le milieu de culture de manière homogène, la durée de la cinétique de croissance et les mesures à effectuer (2 diamètres de colonie toutes les 24 h pendant 5 jours consécutifs), la façon d'effectuer le pourcentage de germination (délais, quantité de suspension à disposer sur le milieu, nombre de spores à compter), ainsi que les paramètres à prendre en compte pour assurer la robustesse des analyses statistiques.

Les tests *in vitro* réalisés suivant ces protocoles ont permis d'acquérir des données préliminaires concernant l'effet de plusieurs composés phénoliques et triterpénoïdes de synthèse, ainsi que différents extraits naturels de cires sur la croissance et la reproduction des champignons *M. laxa* et *M. fructicola*. **Les acides caféique et férulique inhibent la croissance mycélienne des deux souches de pathogène étudiées**, tandis que **l'acide chlorogénique, la quercétine-3-glucoside, la quercétine-3-rutinoside et les extraits de cires de fruits sensibles favorisent le développement de *M. laxa***. Cependant, les acides férulique et caféique ne sont pas directement présents à la surface des fruits du pêcher, mais se retrouvent sous forme de nombreux dérivés, tels que l'acide 5-caféoylquinique (dans les fruits) ou encore l'acide féruloylquinique (dans les feuilles de pêcher). Par ailleurs, la cinétique de croissance de *M. fructicola* n'est pas influencée par la présence d'acide chlorogénique dans le milieu. La catéchine, l'acide bétulinique, l'acide maslinique, l'acide

oléanolique et les extraits de cires de fruits résistants n'ont montré aucun effet significatif sur le développement mycélien de *M. laxa*. Pour la cyanidine-3-glucoside et l'épicatéchine, les résultats obtenus ne permettent pas de définir leurs effets sur la croissance du champignon. Par contre, les expérimentations réalisées n'ont pas permis de caractériser l'effet des composés et extraits étudiés sur la germination des spores de *Monilinia*. Concernant la production de spores de *M. laxa*, il semblerait que certains composés phénoliques aient une influence : **la cyanidine-3-glucoside ainsi que les acides caféique et chlorogénique tendent à diminuer la concentration de spores produites, alors que la quercétine-3-glucoside augmenterait la sporulation du champignon.**

Si les analyses effectuées en conditions *in vitro* offrent des résultats intéressants concernant la cinétique de croissance de *M. laxa* et *M. fructicola* au contact de composés de surface de pêches, d'autres analyses doivent être menées pour confirmer ces résultats, et acquérir des données sur les éléments de reproduction et de pénétration du pathogène. En effet, les composés phénoliques et triterpénoïdes sont susceptibles d'influencer d'autres facteurs du champignon, notamment la synthèse d'enzymes telles que les cutinases et polygalacturonases, ou encore la production de mélanine et donc la formation d'appressoriums qui pourraient être inhibées par l'acide férulique et la cyanidine-3-glucoside.

Les résultats obtenus permettent de rendre compte des points forts et des points faibles des travaux réalisés afin d'apporter des améliorations aux protocoles et plans d'expérience. De plus, ils ouvrent des perspectives intéressantes pour concevoir de nouvelles expérimentations et explorer de nouvelles pistes.

1. Amélioration à apporter aux tests *in vitro* réalisés

Sporulation et germination des spores

Les expériences concernant la germination des spores et la sporulation des champignons doivent être reconduites car il y a une variabilité trop importante des résultats d'un test à l'autre pour chacun des composés étudiés. Il s'agit d'un paramètre qui n'a pas été pris en compte lors de la mise au point du protocole. En effet, comme il s'agissait d'expériences *in vitro*, réalisées dans les mêmes conditions, l'effet 'date' semblait négligeable. Chaque test doit donc être réalisé à la même date pour l'ensemble des composés, y compris une modalité 'témoin', et en nombre suffisant de répétitions, afin de limiter la variabilité des résultats et ainsi réaliser des analyses statistiques fiables.

Intégrité du film de cires déposé

Contrairement à ce qui pourrait être attendu, les extraits de cires de fruits résistants n'ont pas inhibé le développement de *M. laxa*. Cela pourrait provenir de la présence de fissures dans le film de cires en surface du milieu de culture. Ainsi le champignon profiterait de ces espaces pour puiser les éléments nutritifs du milieu et se développer. Une amélioration de ce protocole doit être effectuée afin d'assurer l'imperméabilité de l'extrait de cires ou encore appauvrir de manière plus conséquente le milieu de culture.

Stabilité des composés dans les milieux nutritifs

Pour ce qui est du protocole mis en place pour l'étude des composés hydrosolubles, une attention particulière devra être portée concernant la stabilité des composés dans le milieu de culture. En effet, il est important de vérifier la conservation du composé dans le milieu au cours du temps. Des mesures de concentration de chaque composé dans le milieu à différents temps permettraient de déterminer si la quantité de composé reste stable ou varie pendant l'expérience.

Concentration des composés dans les milieux nutritifs

Les résultats obtenus au cours d'expériences *in vivo* et *in vitro* antérieures (Fan Su 2012 ; Pauline Mallessard 2013) montrent que, pour des concentrations allant de 0,5 à 2 mM, la croissance de *M. laxa* est ralentie en présence de 2 mM de catéchine ou d'épicatéchine dans le milieu de culture. Cependant ce phénomène n'a pu être reproduit dans cette étude. Cela est peut-être dû à la différence de composition entre les milieux utilisés dans les expériences précédentes et ceux utilisés au cours de ce stage. En effet, le milieu de culture employé au cours de cette étude était peut-être trop riche en nutriments puisque la modalité 'témoin' croît plus vite que la modalité 'témoin' des études antérieures. Les conditions de croissance mises en place précédemment étaient certainement plus discriminantes. Par ailleurs, l'inhibition du développement du champignon n'a pu être observée lorsque celui-ci est au contact de 2 mM d'acide chlorogénique, composé connu pour être présent en grande quantité dans des fruits résistants à la pourriture brune. Au contraire, l'acide chlorogénique favorise ici la croissance mycélienne. 2 mM pourrait correspondre à la limite minimale pour laquelle un composé commence à influencer sur la croissance du champignon. Il serait intéressant de reproduire cette expérience en augmentant la concentration au-delà de 2 mM ou de se rapprocher de la teneur réellement présente chez les génotypes les plus résistants à *Monilinia* spp. En effet, chez certains génotypes de pêches et nectarines du GAFL, la concentration en acide chlorogénique dans l'épiderme est environ 3 fois supérieure à celle de la catéchine.

2. Propositions de nouvelles expérimentations

Tests d'autres composés et de mélanges

D'autres métabolites, tels que les composés organiques volatils (COV), pourraient être étudiés. En effet, en plus de jouer un rôle dans la protection des plantes contre les stress thermique et oxydatif, ou dans les interactions entre plantes-organismes telle que l'attraction des pollinisateurs, les terpénoïdes volatils sont impliqués dans la défense contre les pathogènes et insectes ravageurs (Tholl 2015). Une analyse des COV de plusieurs génotypes de *P. persica* est actuellement en cours au GAFL. Cette étude consiste à identifier les COV émis par des fruits (blessés ou non blessés) et d'évaluer leur taux d'infection par *M. laxa*.

L'étude réalisée a porté sur l'effet fongicide d'extraits de cires ou de composés testés indépendamment les uns des autres. Cependant la composition de l'épiderme de pêche est

bien plus complexe puisqu'il s'agit d'un mélange incluant de nombreux composants (alcanes, alcools gras, acides gras, composés phénoliques, triterpénoïdes, composés organiques volatils...). Connaître l'effet d'un composant seul sur *Monilinia* spp. permet d'élargir les connaissances concernant leur rôle, mais cet effet peut être sous-estimé ou sur-évalué si les autres composants ne sont pas pris en compte. En effet, certains composés peuvent agir en synergie s'ils sont combinés, et n'avoir aucun effet s'ils sont testés séparément. Cela pourrait expliquer le fait que le champignon se développe correctement, voire davantage, en présence d'acide oléanolique ou d'acide chlorogénique alors qu'une inhibition est attendue. La poursuite de cette étude doit prendre en compte l'influence d'association des divers composés, notamment les alcanes qui représentent la fraction majoritaire des cires chez certaines espèces végétales (Yin et al. 2011), et étudier l'effet synergique de ceux-ci au sein d'un même milieu de culture.

Pour commencer, une approche telle que celle employée par Yin et al. (2011) pourrait être mise en œuvre de façon à tester des mélanges de composés. Dans un premier temps, l'extraction de cires est effectuée à l'aide d'un mélange de solvants polaires intermédiaires (chloroforme/méthanol 3:1) afin de maximiser la solubilité de tous les constituants de cires. Ensuite, les cires sont séparées en fonction de leur polarité : la fraction faiblement polaire (alcanes) est comparée à la fraction polaire (acides gras, triterpénoïdes). La fraction polaire montre une activité antifongique nettement supérieure, puisqu'elle inhibe significativement la germination des spores et le développement mycélien d'*A. alternata*. Cependant l'effet fongicide des alcanes vis-à-vis des champignons pathogènes doit être considéré puisqu'ils peuvent avoir une activité antifongique due à la présence d'inhibiteurs dans les cires (Kolattukudy et al. 1995).

Etude d'autres facteurs liés au pouvoir pathogène du champignon

Certains composés pourraient influencer d'autres facteurs nécessaires à l'infection par le champignon que ceux considérés dans cette étude.

Patil et Dimond (1967) ont montré que les produits issus de l'oxydation de l'acide chlorogénique (les chlorogénoquinone) sont capables d'inhiber les polygalacturonases produites par le champignon (enzymes responsables de la dégradation des parois), et agissent donc en inactivant les enzymes impliquées dans la pathogénicité. Cela est corroboré par les résultats obtenus par Lee et Bostock (2007) qui démontrent l'inhibition de la synthèse de polygalacturonases et de la formation d'appressoriums par l'acide chlorogénique. De plus, de fortes teneurs en acides chlorogénique et caféique inhiberaient l'activité des cutinases de *M. fructicola* en réprimant l'expression du gène *Mfcut1* (Lee et Bostock 2007). Ces composés sont présents en grande quantité à la surface de pêches résistantes (Bolinha) à *M. fructicola* (Bostock et al. 1999 ; Lara et al. 2014), suggérant que l'inhibition de l'activité des cutinases pourrait prévenir l'infection.

Par ailleurs, les composés phénoliques et triterpénoïdes, ainsi que leurs dérivés, seraient responsables de la résistance des fruits vis-à-vis de la pourriture brune en interférant avec les processus requis pour l'infection et non en tant que composés fongicides. Afin de vérifier l'effet des composés sur la production de cutinases de *M. laxa*, l'idée est de procéder à une extraction d'ARN du pathogène cultivé au contact d'un composé, puis de quantifier l'expression du gène responsable de la production de cutinases

à l'aide d'amorces spécifiques (*Mfcut1* chez *M. fructicola*). Malheureusement, le génome de *M. laxa* n'ayant pas été entièrement séquencé à ce jour, cette méthode n'a pas pu être réalisée (séquençage en cours de publication, soumis à la base de données NCBI en novembre 2017). Un autre procédé permettant d'analyser l'activité des cutinases du champignon a été développé par Bostock et al. (1999). Cela consiste à inoculer avec une suspension de spores un milieu de culture contenant de la cutine de pomme et un composé dissous dans du méthanol. L'activité des cutinases est ensuite mesurée quotidiennement avec du p-nitrophenyl butyrate. Ce genre de méthode permettrait de déterminer les composés et extraits de cires susceptibles d'inhiber la synthèse de cutinases par *M. laxa* et *M. fructicola*.

En plus de jouer un rôle dans le goût des fruits (astringence, acidité), leur couleur, et leurs bienfaits pour la santé (antioxydant), les composés phénoliques, tout comme les triterpénoïdes, participent aux mécanismes de défense naturelle des plantes (Slimestad et al. 2009). La sélection variétale pour la résistance aux maladies est l'un des challenges les plus importants pour l'amélioration des cultures puisque le développement de maladies est simultanément influencé par l'agent, l'hôte, l'environnement, et l'intervention humaine. Il est donc nécessaire de prendre en compte ces différents facteurs et d'acquérir suffisamment de connaissances pour gérer au mieux la résistance des plantes face aux maladies tout en réduisant drastiquement le nombre d'applications fongicides en verger commercial. En effet, dans un contexte de changement climatique associé à la prise de conscience internationale concernant l'importance du maintien et du développement de nos ressources végétales, il apparaît crucial de mettre au point des pratiques culturales et de développer des génotypes capables d'accumuler ou d'accumuler des composés d'intérêt.

Diverses approches doivent être approfondies afin de d'acquérir des moyens de luttés efficaces contre *Monilinia* spp. Pour cela, l'identification et le développement de génotypes résistants à cette maladie, ainsi que l'étude de métabolites secondaires représentent donc un intérêt majeur. Les résultats obtenus concernant l'effet des composés phénoliques et triterpénoïdes vis-à-vis de *M. laxa* et *M. fructicola* semblent prometteurs et permettent ainsi d'orienter les futures recherches dans le domaine.

Références bibliographiques

- Andreotti C.**, Ravaglia D., Ragaini A., and Costa G. (2008). Phenolics compounds in peach (*Prunus persica*) at harvest and during fruit maturation. *Annals of Applied Biology*, 153, 11–23
- Belge B.**, Llovera M., Comabella E., Gatus F., Guillén P., Graell J. and Lara I. (2014a). Characterization of cuticle composition after cold storage of Celeste and Somerset sweet cherry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8722–8729
- Belge B.**, Llovera M., Comabella E., Graell J. and Lara I., (2014b). Fruit cuticle composition of a melting and a nonmelting peach cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3488–3495
- Bostock R.M.**, Wilcox S.M., Wang G. and Adaskaveg J.E. (1999). Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 54(1–2): 37-50
- Butler M.J.** and Day A.W. (1998). Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 1115-1136
- Chen S. J.**, Li Y. C., Bi Y., Yin Y., Ge Y. H., and Wang Y. (2014). Solvent effects on the ultrastructure and chemical composition of cuticular wax and its potential bioactive role against *Alternaria alternate* in Pingguoli pear. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(5): 1137-1145
- Chiu C.-M.**, You B.-J., Chou C.-M., Yu P.-L., Yu F.-Y., Pan S.M, Bostock R. M., Chung K.-R. and Lee M.-H (2013). Redox status-mediated regulation of gene expression and virulence in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *Plant Pathology*, 62: 809–819.
- Chu W.**, Gao H., Chen H., Fang X. and Zheng Y. (2017). Effects of cuticular wax on the postharvest quality of blueberry fruit. *Food Chemistry*, 239, 68–74
- De Cal A. and Melgarejo P.** (1994). Effects of *Penicillium frequentans* and its antibiotics on unmelanized hyphae of *Monilinia laxa*. *Phytopathology*- New Yourk and Baltimore Then St Paul 84: 1010-1010
- España L.**, Heredia-Guerrero J.A., Segado P., Benítez J.J., Heredia A., and Domínguez E. (2014). Biomechanical properties of the tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticle during development are modulated by changes in the relative amounts of its components. *New Phytologist*, 202, 790–802
- Fan J.-Y.**, Guo L.-Y., et al. (2010). Genetic diversity of populations of *Monilinia fructicola* (Fungi, Ascomycota, Helotiales) from China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57: 206-212
- Fan Su** (2012). Stagiaire au GAFL : Characterization of the inhibitory effect of peach surface phenolic compounds on the conidial germination and pathogenicity of *Monilinia laxa*.

- Feliciano A., Feliciano A. J., et al. (1987).** *Monilinia fructicola* resistance in peach cultivar Bolinha. *Phytopathology*, 77: 776-780.
- Fernandez V., Khayet M., Montero-Prado P., Heredia-Guerrero J.A., Liakopoulos G., Karabourniotis G., del Río V., Domínguez E., Tacchini I., Nerín C., Val J. and Heredia A. (2011).** New insights into the properties of pubescent surfaces: peach fruit as a model. *Plant Physiology*, 156: 2098-2108
- Furtado N. A. J. C., Pirson L., Edelberg H., Miranda L. M., Loira-Pastoriza C., Preat V., Larondelle Y. et André C. M. (2017).** Pentacyclic triterpene bioavailability : an overview of *in vitro* and *in vivo* studies. *Molecules*, 22, 400
- Hammerschmidt R. (2014).** Chlorogenic acid: A versatile defense compound. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 88 (2014) iii-iv
- Hong C., Holtz B.A., Morgan D.P. and Michailides T.J. (1997).** Significance of thinned fruit as a source of the secondary inoculum of *Monilinia fructicola* in California nectarine orchards. *Plant Disease*, 81, 519–524.
- Hu H., Liu Y., Shi G. L., Liu Y. P., Wu R. J., Yang A. Z., et al. (2011).** Proteomic analysis of peach endocarp and mesocarp during early fruit development. *Physiologia Plantarum*, 142, 390–406.
- Jesus J. A., Lago J. H. G., Laurenti M. D., Yamamoto E. S. and Passero L. F. (2015).** Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids : an update. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2015, Article ID 620472
- Jetter R, Schäffer S, Riederer M. (2000).** Leaf cuticular waxes are arranged in chemically and mechanically distinct layers: evidence from *Prunus laurocerasus* L. *Plant, Cell and Environment*, 23, 619–628
- Jetter R. and Schäffer S. (2001).** Chemical composition of the *Prunus laurocerasus* leaf surface: Dynamic changes of the epicuticular wax film during leaf development. *Plant Physiology*, 126, 1725–1737
- Kolattukudy P.E., Rogers L.M., Li D., Hwang C. and Flaishman M.A. (1995).** Surface signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 4080-4087
- Kunst L., and Samuels A. L. (2003).** Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, 42, 51–80
- Lara I., Belge B., and Goulao L. F. (2014).** The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 103–112
- Lara I., Belge B., and Goulao L. F. (2015).** A focus on the biosynthesis and composition of cuticle in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4005–4019
- Lee M.H. and 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
- Lee Y.H. and Dean R.A. (1994).** Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Let*, 115:71–74

- Lv Y., Tahir I. I. and Olsson M. E. (2015).** Factors affecting the content of the ursolic and oleanolic acid in peel: influence of cultivars, sun exposure, storage conditions, bruising and *Penicillium expansum* infection. *J Sci Food Agric*, 96: 2161–2169
- Mikulic Petkovsek M., Slatnar A., Stampar F. and Veberic R. (2011).** Phenolic compounds in apple leaves after infection with apple scab. *Biologia plantarum*, 55 (4): 725-730
- Pascal T., Levigneron A., et al. (1994).** Evaluation of two screening methods for resistance of apricot, plum and peach to *Monilinia laxa*. *Euphytica*, 77(1-2): 19-23
- Patil S.S. and Dimond A.E. (1967).** Inhibition of *Verticillium* polygalacturonase by oxidation products of polyphenols. *Phytopathology*, 57:492-6.
- Pauline Mallessard (2013) :** Stagiaire au GAFL : Variabilité de sensibilité à *Monilinia laxa* chez la pêche.
- Pensec F., Pączkowski C., Grabarczyk M., Wozniak A., Benard-Gellon M., Bertsch C. Chong J. and Szakiel A. (2014).** Changes in the triterpenoid content of cuticular waxes during fruit ripening of eight grape (*Vitis vinifera*) cultivars grown in the upper Rhine valley. *J. Agric. Food Chem*, 62, 7998–8007
- Prusky D. (1996).** Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 413–34
- Radovanović B. C., Anđelković A. S. M., Radovanović A. B. and Anđelković M. (2013).** Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12: 813-819
- Rios J.C., Robledo F., Schreiber L., Zeisler V., Lang E. Carrasco B. and Silva H. (2015).** Association between the concentration of n-alkanes and tolerance to cracking in commercial varieties of sweet cherry fruits. *Scientia Horticulturae*, 197 (2015) 57–65
- Rufino-Palomares E., Pérez-Jiménez A., Reyes-Zurita F. J., García-Salguero L., Mokhtari K., Herrera-Merchán A., Medina P. P., Peragón J. and Lupiáñez J. A. (2015).** Anti-cancer and anti-angiogenic properties of various natural pentacyclic tri-terpenoids and some of their chemical derivatives. *Current Organic Chemistry*, 19, 919-947
- Santin M., Lucini L., Castagna A., Chiodelli G., Hauser M-T. and Ranieri A. (2018).** Post-harvest UV-B radiation modulates metabolite profile in peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 127–134
- Slimestad R., Vangdal E. and Brede C. (2009).** Analysis of phenolic compounds in six Norwegian plum cultivars (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11370–11375
- Tholl D. (2015).** Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148: 63–106
- Treutter D. and Feucht W. (1990).** Accumulation of flavan-3-ols in fungus-infected leaves of Rosaceae. - Z. Pflanzenkr. *Pflanzenpathol. Pflanzenschutz*, 97: 634-641

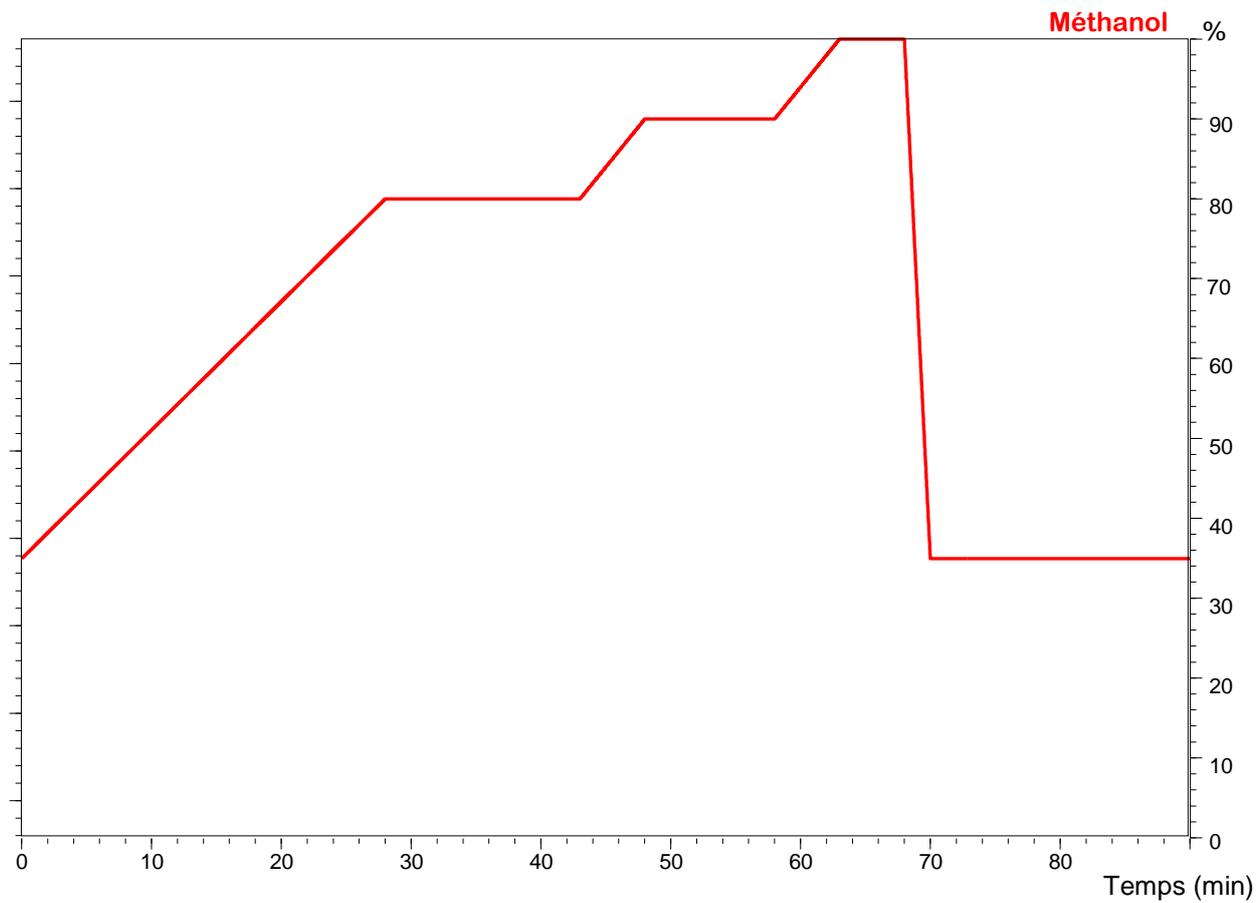
- Villarino M., Sandín-Espana P., Melgarejo P., and De Cal A. (2011).** High chlorogenic and neochlorogenic acid levels in immature peaches reduce *Monilinia laxa* infection by interfering with fungal melanin biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3205–3213.
- Villarino M., Melgarejo P., De Cal A. (2016).** Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 227: 6–12
- Wilson C. L., Franklin J. D., and Otto B. E. (1987).** Fruit volatiles inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 71: 316-319
- Yáñez-Mendizábal V., Zeriouh H., Viñas I., Torres R., Usall J., de Vicente A., Pérez-García A. and Teixidó N. (2012).** Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 132:609–619
- Yin Y., Bi Y., Chen S., Li Y., Wang Y., Ge Y. and Zhang Z. (2011).** Chemical composition and antifungal activity of cuticular wax isolated from Asian pear fruit (cv. Pingguoli). *Scientia Horticulturae*, 129(4), 577–582
- Zhang H. and Tsao R. (2016).** Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr. Opin. Food Sci.* 8, 33–42

ANNEXES

Annexe 1 : Volume de chloroforme utilisé pour la réalisation des extraits de cires de Zéphir (ZE) et Summergrand (SG) à 2 stades de développement (I et II).

Génotype	Surface totale des fruits utilisés pour l'extraction en masse (cm ²)	Surface d'une boîte (cm ²)	Volume de chloroforme nécessaire (ml)
SG 2017 I	1648,02	64	77,25
SG 2018 I	1121,51		52,57
ZE 2013 I	2769,54		129,38
SG 2017 II	2172,80		101,85
SG 2018 II	2541,42		119,13
ZE 2013 II	2390,00		112,03

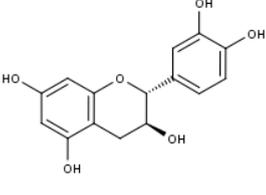
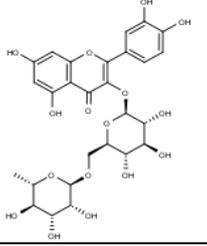
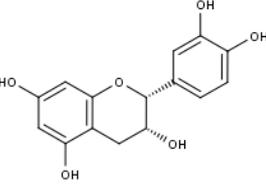
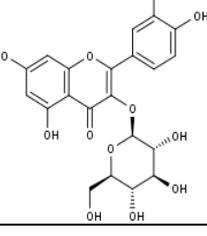
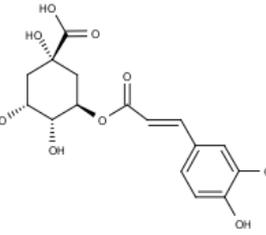
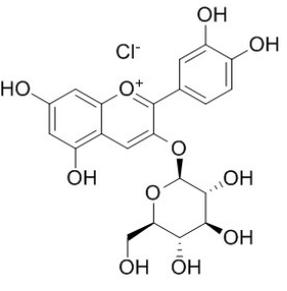
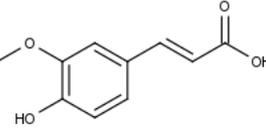
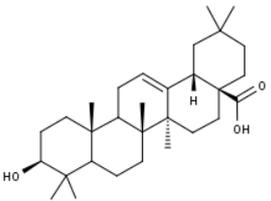
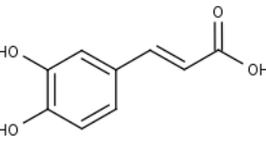
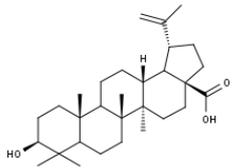
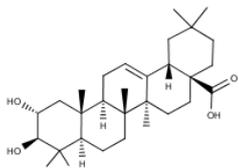
Annexe 2 : Gradient d'élution méthanol/eau utilisé pour identifier et quantifier les composés par HPLC-DAD. La courbe représente le pourcentage de méthanol injecté au cours de l'élution des composés.



Annexe 3 : Tableau des composés phénoliques et triterpénoïdes de *Prunus persica* corrélés aux traits d'infection par *Monilinia* spp. (d'après des données obtenues entre 2013 et 2017, GAFL INRA)

Classe	Groupe	Nom du composé	Abréviation
TERPENES	Triterpénoïde	Acide trihydroxy-urs-12-en-28-oic	thu2
	Triterpénoïde	Acide maslinique	a_mas
	Triterpénoïde	Acide oléanolique	a_ole
	Dérivé triterpénoïde	Acide p-coumaroyl-dihydroxy-urs-12-en-28-oic	cdhu2
	Dérivé triterpénoïde	Acide p-coumaroyl-dihydroxy-urs-12-en-28-oic	cdhu3
	Dérivé triterpénoïde	Acide p-coumaroyl-dihydroxy-urs-12-en-28-oic	cdhu4
	Dérivé triterpénoïde	Acide p-coumaroyl-dihydroxy-urs-12-en-28-oic	cdhu5
	Dérivé triterpénoïde	Acide p-coumaroyl-dihydroxy-urs-12-en-28-oic	cdhu6
	Dérivé triterpénoïde	Acide 3 β -p-coumaroyloxy-urs-12-en-28-oic	cou1
	Dérivé triterpénoïde	Acide 3 β -p-coumaroyloxy-urs-12-en-28-oic	cou3
Dérivé triterpénoïde	Acide 3 β -p-coumaroyloxy-urs-12-en-28-oic	cou4	
COMPOSES PHENOLIQUES	Flavanol	Procyanidine B1	procyab1
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide cis-neochlorogénique	c3CQ
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide neochlorogénique	t3CQ
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide chlorogénique	t5CQ
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide cryptochlorogénique	t4CQ
	Dérivé hydroxycinnamique	Acide cis-chlorogénique	c5CQ
	Flavanol	Quercétine-3-galactoside	q3gal
	Flavanol	Quercétine-3-glucoside	q3glu
	Flavanol	Quercétine-3-rutinoside	q3rut
	Flavanol	Kaempferol-3-rutinoside	k3rut
	Flavanol	Isorhamnétine-3-glucoside	i3glu
	Flavanol	Isorhamnétine-3-rutinoside	i3rut
	Anthocyanine	Cyanidine-3-glucoside	c3glu
Anthocyanine	Cyanidine-3-rutinoside	c3rut	

Annexe 4 : Caractéristiques des composés phénoliques et triterpénoïdes étudiés.

Composé	Structure	Fournisseur Pureté	Composé	Structure	Fournisseur Pureté
Catéchine $C_{15}H_{14}O_6$		Extrasynthèse ≥ 90 %	Quercetine-3- rutinoside $C_{27}H_{30}O_{16}$		Extrasynthèse ≥ 99 %
Epicatechine $C_{15}H_{14}O_6$		Extrasynthèse ≥ 90 %	Quercetine-3- glucoside $C_{21}H_{20}O_{12}$		Sigma-Aldrich 90 %
Acide chlorogénique $C_{16}H_{18}O_9$		Extrasynthèse 98 %	Cyanidine-3- glucoside $C_{21}H_{21}O_{11}Cl$		Extrasynthèse 96 % Phytolab 96 %
Acide férulique $C_{10}H_{10}O_4$		Sigma-Aldrich 99 %	Acide oléanolique $C_{30}H_{48}O_3$		Sigma-Aldrich ≥ 97 %
Acide caféique $C_9H_8O_4$		Sigma-Aldrich ≥ 98 %	Acide bétulinique $C_{30}H_{48}O_3$		Extrasynthèse ≥ 97 %
Acide maslinique $C_{30}H_{48}O_4$		Phytolab 98 %			

Annexe 5 : Composition des différents milieux de culture utilisés.

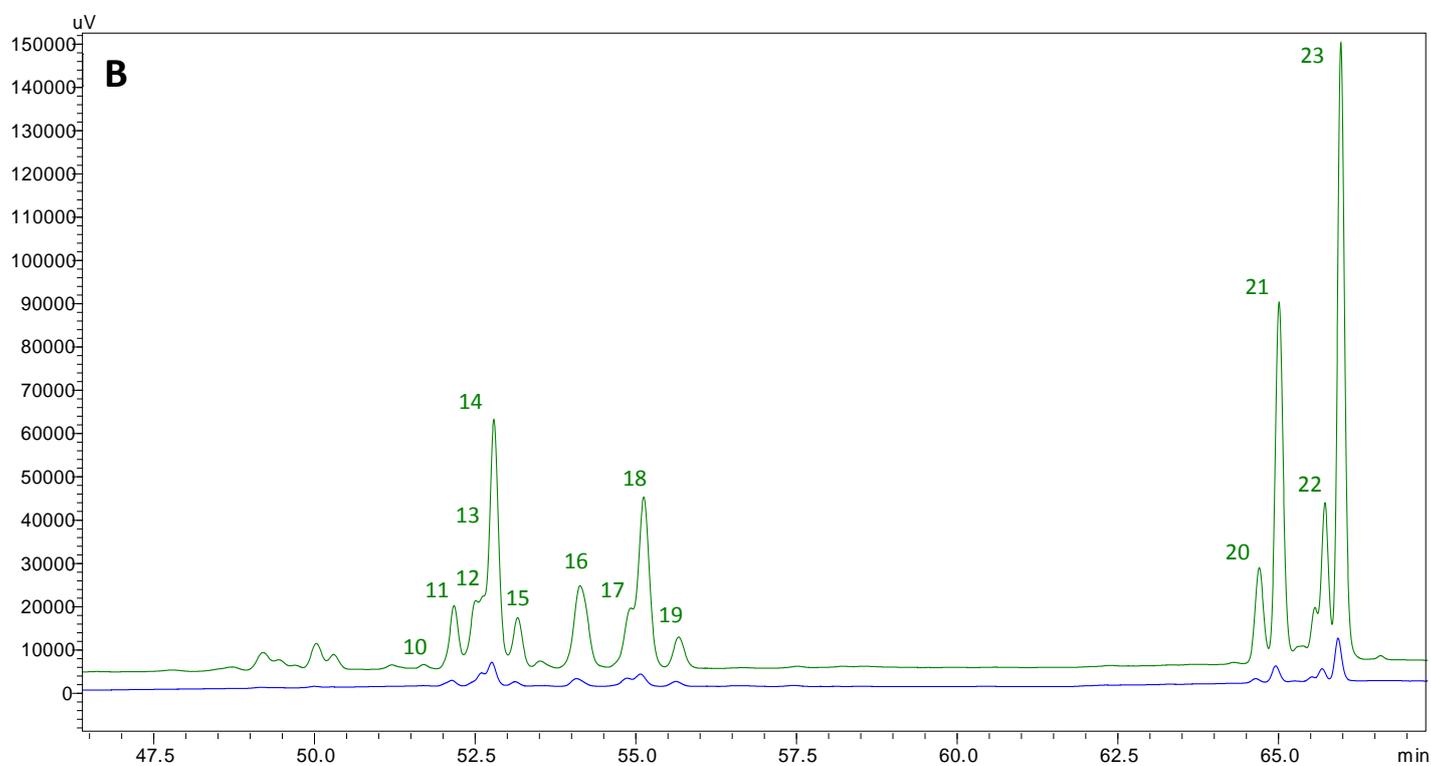
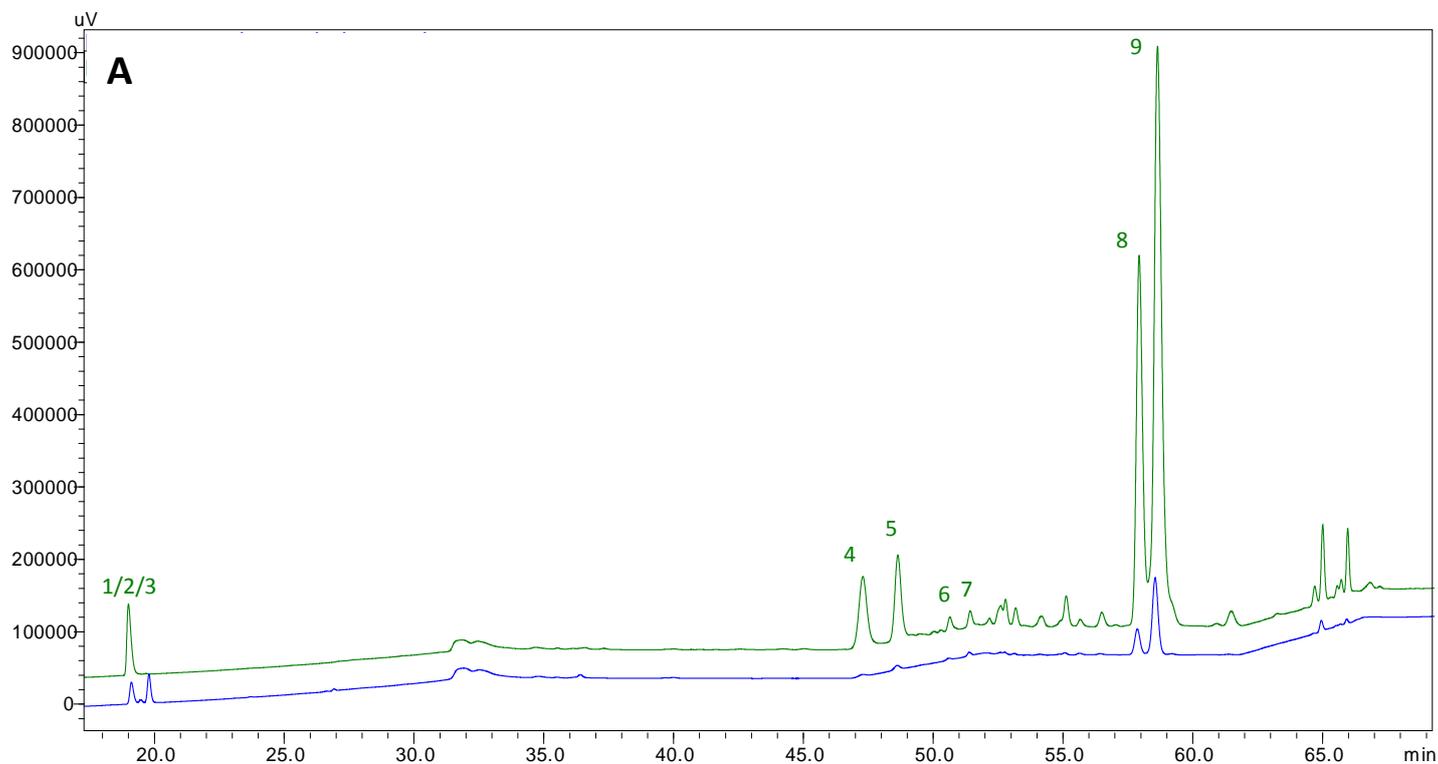
- V8 : 200 ml de solution de V8 pure, 20 g d'agar, 2 g d'extrait de levure, 2 g de glucose, 1 g de carbonate de calcium et 800 ml d'eau stérile, pH ajusté à 5,2
- V8 dilué : 50 ml de solution de V8 pure (purée à base de 8 légumes), 950 ml d'eau stérile, le reste est identique
- Potato Dextrose Agar (PDA) : 39 mg de poudre PDA (contenant 20 mg de dextrose, 15 mg d'agar, et 4 mg d'amidon de pomme de terre) dilué dans 1 L d'eau stérile

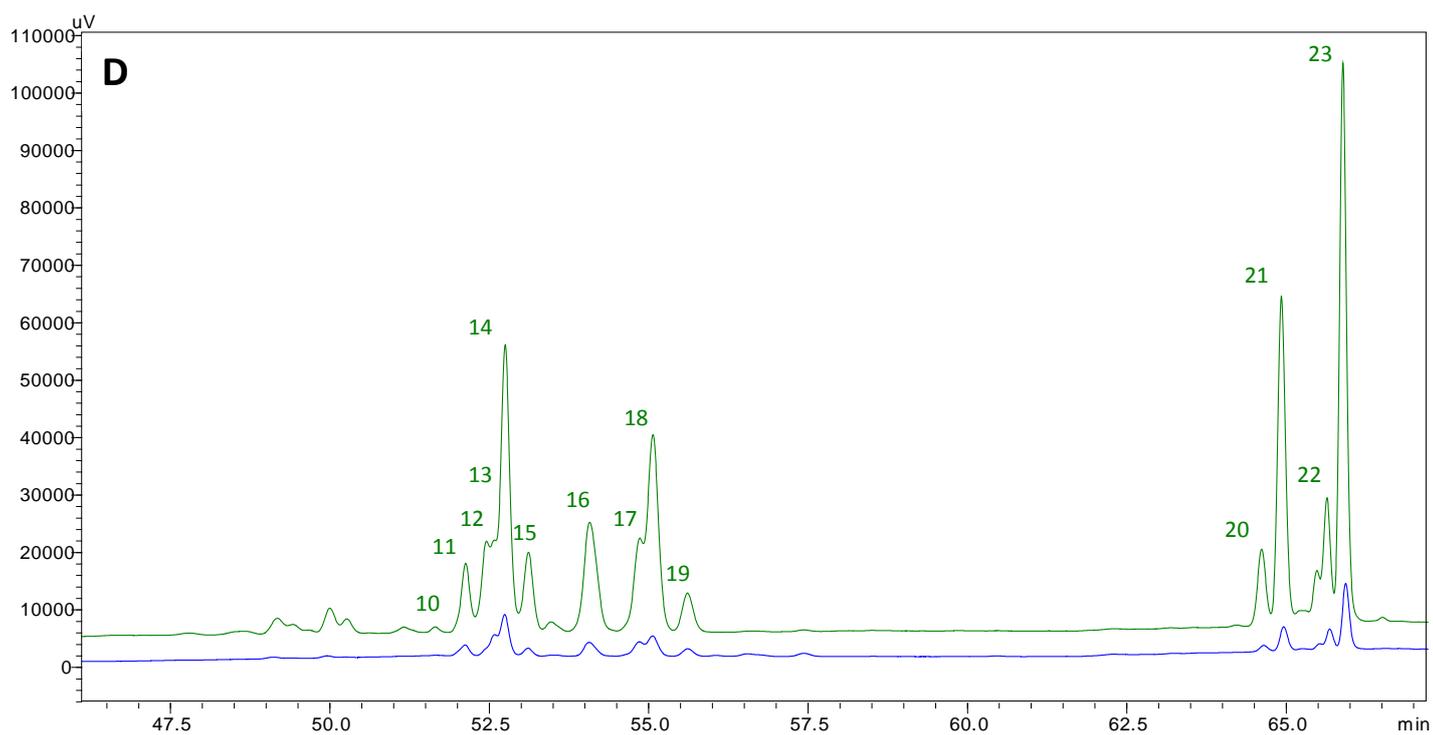
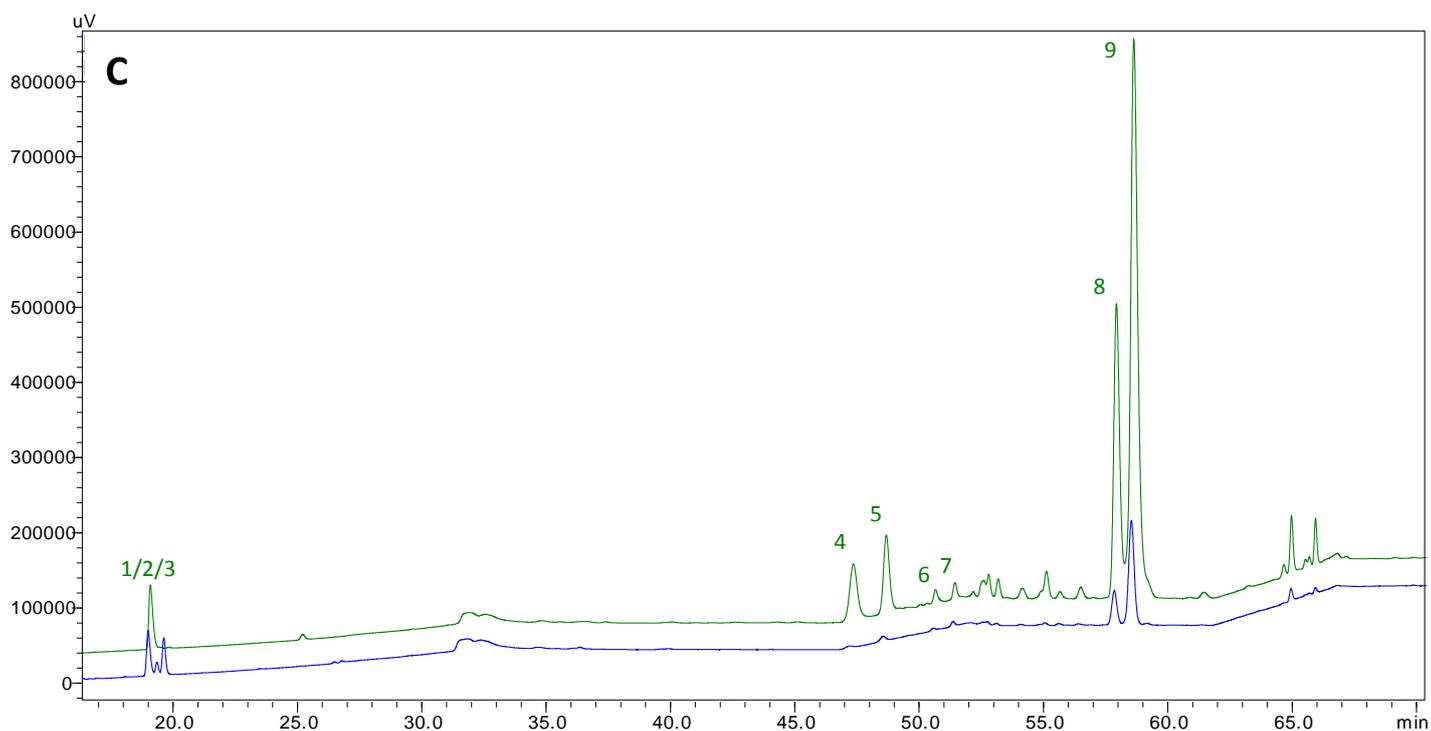
Annexe 6 : Quantité de composé utilisé pour réaliser les milieux de culture.

Composé	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Solution mère (mM)	Composé dans le milieu (mM)	V8 dilué (ml)	Ethanol (μl)	Quantité de composé dissout (mg)
Catéchine	290,26	40	2	70	700	40,6
Epicatechine	290,26					40,6
Acide chlorogénique	354,31					49,6
Acide férulique	194,18					27,1
Acide caféique	180,16					25,2
Quercetine-3-rutinoside	610					85,4
Quercetine-3-glucoside	464					64,9
Cyanidine-3-glucoside	450					63

Composé	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	V8 dilué (ml)	Chloroforme (ml)	Quantité de composé dissout (mg)
Acide oléanolique	456,7	45	27	28,6
Acide bétulinique	456,7			
Acide maslinique	471			

Annexe 7 : Identification des composés présents dans les cires de Zéphir (A et B) et Summergrand (C et D) aux stades sensible (en bleu) et résistant (en vert) à 210 nm (A et C) et 315 nm (B et D).





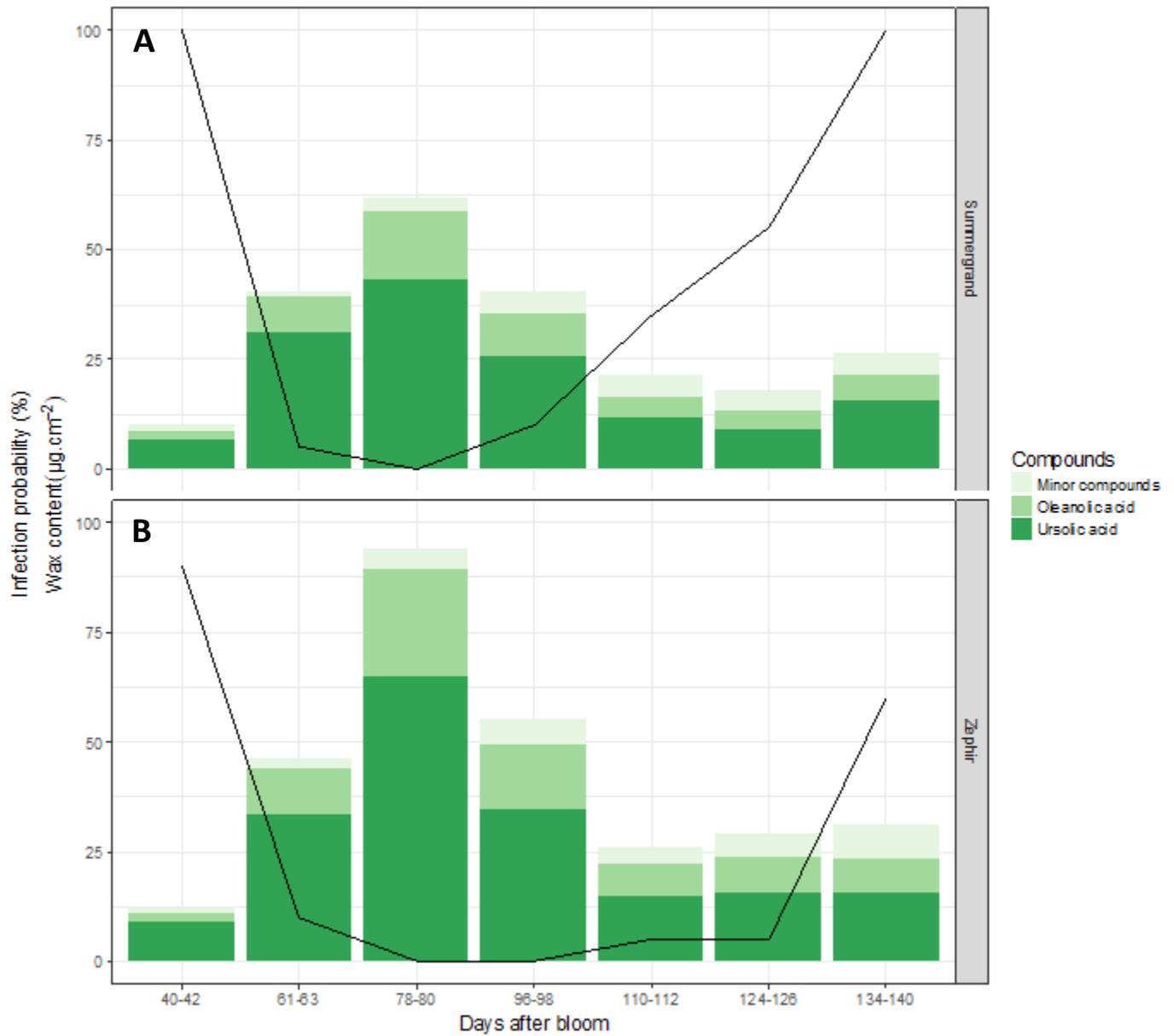
(1) pcdhpa1, (2) pcdhpa2, (3) pcdhpa3, (4) thu1, (5) thu2, (6) acide maslinique (7) acide corosolique (8) acide oléanolique, (9) acide ursolique, (10) cdhu0, (11) cdhu1, (12) cdhu2, (13) cdhu3, (14) cdhu4, (15) cdhu5, (16) cdhu6, (17) cdhu7, (18) cdhu8, (19) cdhu9, (20) cou1, (21) cou2, (22) cou3, (23) cou4.

Annexe 8 : Composés phénoliques, triterpénoïdes et leurs dérivés quantifiés ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) à partir d'extraits de cires de Zéphir (ZE) et Summergrand (SG) aux stades sensible (I) et résistant (II) sur 4 années.

Composés		ZE I 2018	SG I 2018	ZE II 2018	SG II 2018	ZE I 2017	SG I 2017	ZE II 2017	SG II 2017	ZE I 2014	SG I 2014	ZE II 2014	SG II 2014	ZE I 2013	SG I 2013	ZE II 2013	SG II 2013
Triterpénoïdes	a_ole ($\mu\text{g ole}/\text{cm}^2$)	8,982	4,095	37,647	33,190	4,819	3,489	34,120	30,644	19,740	10,173	35,998	31,296	2,949	2,508	16,830	18,596
	a_urs ($\mu\text{g urs}/\text{cm}^2$)	33,571	15,640	84,615	90,090	20,669	15,020	99,047	98,667	72,209	42,245	102,711	93,983	12,415	11,550	58,665	54,926
	thu1 ($\mu\text{g eq urs}/\text{cm}^2$)	0,890	0,311	10,430	9,026	0,409	0,662	8,892	7,633	2,284	1,313	9,304	7,777	0,387	0,320	3,882	5,741
	thu2 ($\mu\text{g eq urs}/\text{cm}^2$)	1,763	0,688	9,852	10,083	0,562	1,042	9,378	8,900	3,408	1,539	9,486	7,989	0,648	0,587	4,472	5,987
	a_mas ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	0,455	0,257	1,345	1,371	traces	traces	traces	traces	traces	1,784	0,786	1,274	0,893	0,233	0,353	0,485
a_cor ($\mu\text{g eq mas}/\text{cm}^2$)	0,782	0,489	1,248	1,499	traces	traces	traces	traces	traces	2,231	1,502	1,655	1,522	0,437	0,465	0,678	0,792
Composés phénoliques ($\mu\text{g eq pc}/\text{cm}^2$)	pcdha1	0,030	0,041	traces	0,004	0,023	0,025	0,002	0,002	0,279	0,207	0,002	0,005	0,036	0,047	0,003	0,001
	pcdha2	0,138	0,170	traces	0,009	0,134	0,133	0,006	0,008	1,038	0,730	0,008	0,015	0,127	0,156	0,008	0,004
	pcdha3	0,083	0,038	traces	traces	0,004	0,006	traces	traces	0,014	0,009	0,001	0,001	0,002	0,002	ND	ND
Dérivés triterpénoïdes ($\mu\text{g eq urs}/\text{cm}^2$)	cdhu0	ND	ND	0,037	0,039	ND	ND	ND	0,022	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	cdhu1	0,290	0,142	0,723	0,712	0,224	0,198	0,352	0,339	0,232	0,341	0,396	0,365	0,029	0,022	0,388	0,497
	cdhu2	0,145	0,053	0,684	0,832	0,462	0,345	0,494	0,459	0,188	0,139	0,498	0,501	0,003	0,002	ND	ND
	cdhu3	0,437	0,197	0,522	0,481	ND	ND	ND	ND	1,532	1,944	2,824	2,345	0,131	0,103	1,660	2,159
	cdhu4	1,092	0,508	2,894	3,092	0,584	0,585	2,207	1,940	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	cdhu5	0,196	0,096	0,586	0,828	0,097	0,086	0,447	0,439	0,232	0,225	0,413	0,454	ND	ND	ND	ND
	cdhu6	0,464	0,229	1,401	1,619	0,200	0,199	0,778	0,763	0,337	0,380	0,846	0,799	0,033	0,028	0,386	0,495
	cdhu7	0,418	0,202	0,627	0,975	0,207	0,192	0,599	0,620	0,417	0,417	0,419	0,499	0,038	0,031	0,303	0,286
	cdhu8	0,674	0,305	2,443	2,433	0,345	0,299	1,429	1,164	0,663	0,827	1,949	1,538	0,062	0,050	0,887	1,292
	cdhu9	0,264	0,112	0,396	0,464	0,159	0,130	0,199	0,228	0,228	0,249	0,336	0,343	0,021	0,015	0,229	0,214
	cou1	0,150	0,062	0,950	0,675	ND	ND	0,423	0,393	0,393	0,161	0,501	0,457	0,018	0,013	0,112	0,257
	cou2	0,613	0,244	3,450	2,836	ND	ND	1,672	1,532	1,532	0,744	2,119	1,904	0,094	0,074	0,507	1,094
	cou3	0,439	0,199	1,314	0,916	ND	ND	0,470	0,343	0,343	0,666	0,652	0,589	0,026	0,019	0,164	0,374
cou4	1,543	0,640	5,500	4,462	ND	0,673	2,418	2,245	2,245	1,906	1,937	3,558	0,174	0,123	0,957	1,766	

ND : non détecté
traces : concentration < 0,001 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Annexe 9 : Corrélation entre la probabilité d'infection (%) et la composition en triterpénoïdes ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) entre 40 et 140 jours après floraison pour les géotypes Summergrand (A) et Zéphir (B)



Annexe 10 : Tableau récapitulatif des effets significatifs (p -value < 0,01) sur les paramètres de croissance mycélienne des modalités témoins de *M. laxa* pour les expériences menées sur les composés de synthèse et extraits naturels de cires

p -value pour <i>M. laxa</i>	Témoin (composés phénoliques)	Témoin (triterpénoïdes et extraits de cires)
Spore	0.7993	0.43471
HeureObs	0.0001082 ***	< 2e-16 ***
DataManip	<2e-16 ***	0.001365 **
Spore:HeureObs	0.4325	0.01883 *
DateManip:HeureObs	0.1008662	9.379e-11 ***

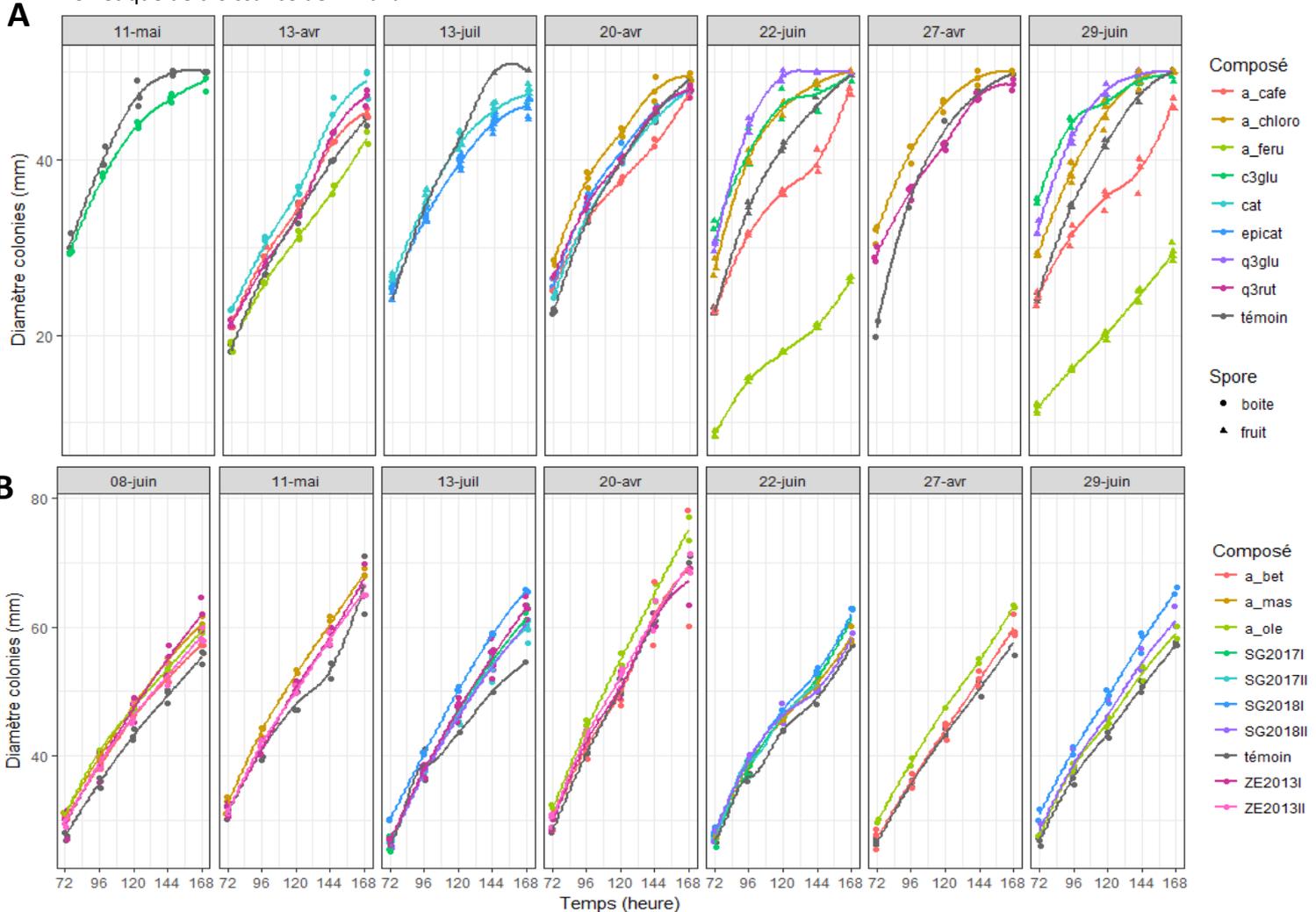
* : p -value < 0.05

** : p -value < 0.01

*** : p -value < 0.001

Annexe 11 : Cinétique de croissance de *M. laxa* cultivé sur milieu V8 dilué contenant des composés phénoliques (A) et triterpénoïdes (B) de synthèse ou extraits naturels de cires (B)

Cinétique de croissance de *M. laxa*



Résumé

La pourriture brune est une maladie fongique provoquée par *Monilinia* spp., responsable de pertes de production importantes chez le pêcher (*Prunus persica*). Afin de prévenir et de limiter l'utilisation massive de produits chimiques, des alternatives visant à contrôler cette maladie sont de promouvoir les défenses naturelles des fruits et de développer des biofongicides. Pour contribuer à ces objectifs, cette étude visait à identifier les métabolites secondaires des fruits limitant la croissance et la reproduction du champignon. Cette étude a permis de mettre au point des protocoles afin de tester *in vitro* l'effet de composés phénoliques, de triterpénoïdes, et d'extraits naturels de cires présents à la surface de nectarines sur la croissance et la reproduction de *M. laxa* et *M. fructicola*. Il est apparu que l'acide chlorogénique, la quercétine-3-glucoside, la quercétine-3-rutinoside, et les extraits de cires issues de fruits sensibles au champignon favorisent la croissance mycélienne de *M. laxa*, tandis que les acides férulique et caféique inhibent le développement de *M. laxa* et *M. fructicola*. De plus, la production de spores de *M. laxa* semble être inhibée par la cyanidine-3-glucoside, l'acide caféique et l'acide chlorogénique, alors qu'elle a tendance à augmenter en présence de quercétine-3-glucoside. De nombreuses perspectives à ces travaux sont discutées.

Mots-clés : *Monilinia* spp., composés phénoliques, triterpénoïdes, cires cuticulaires, *in vitro*

Abstract

Brown rot is a fungal disease caused by *Monilinia* spp., responsible of important losses in peach (*Prunus persica*) production. To prevent and limit the massive use of chemical products, alternatives to control the disease are to promote natural fruit defenses and develop biofungicides. To contribute to these objectives, this study aimed to identify the secondary fruit metabolites limiting growth and reproduction of the fungus. In this study, the development of *in vitro* protocols has been implemented in order to test the effect of phenolic compounds, triterpenoids, and natural wax extracts of peach fruit surface on the growth and reproduction capacities of *M. laxa* and *M. fructicola*. It appeared that chlorogenic acid, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-rutinoside, and wax extracts from susceptible fruits enhance the growth of *M. laxa*, whereas ferulic and caffeic acids inhibit the mycelial growth of *M. laxa* and *M. fructicola*. In addition, spores' production of *M. laxa* seems inhibited by cyanidin-3-glucoside, caffeic and chlorogenic acids, while it is more likely to be stimulated by quercetin-3-glucoside. Perspectives to this work are discussed.

Keywords: *Monilinia* spp., phenolic compounds, triterpenoids, cuticular waxes, *in vitro*