

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

Marie-Noëlle CORRE- INRAe GAFL



Rencontres du GIS Fruits - 28 octobre 2020

La pourriture brune (moniliose)

- Un champignon
- Principales espèces: *Monilia laxa*, *M. fructicola* et *M. fructigena*
- Provoque le dessèchement des fleurs et des rameaux et la pourriture des fruits
- Peut provoquer 30 à 40% de pertes de récoltes

Une des maladies les plus dommageables du pêcher et des espèces du genre *Prunus*



Règne : *Fungi*

Embranchement: *Ascomycota*

Famille: *Sclerotiniaceae*

Genre: *Monilia*

Contexte

Contexte

Introduction

Objectifs

1^{ère} approche

2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

La prophylaxie n'est pas assez efficace

La lutte chimique est largement utilisée sur fleurs et fruits

- Impacts sur l'environnement
- Problèmes de santé publique



« La solution »: cultiver des variétés résistantes.



Il n'existe pas de variétés vraiment résistantes pour les producteurs
Aucun facteur de résistance majeur n'a été identifié

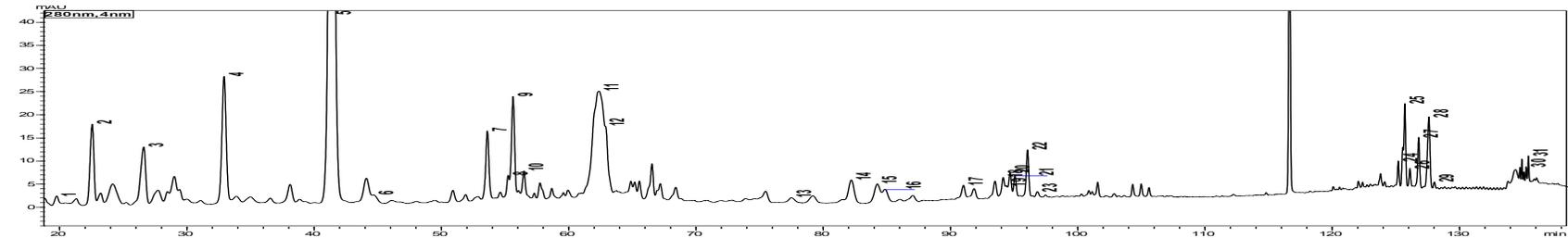
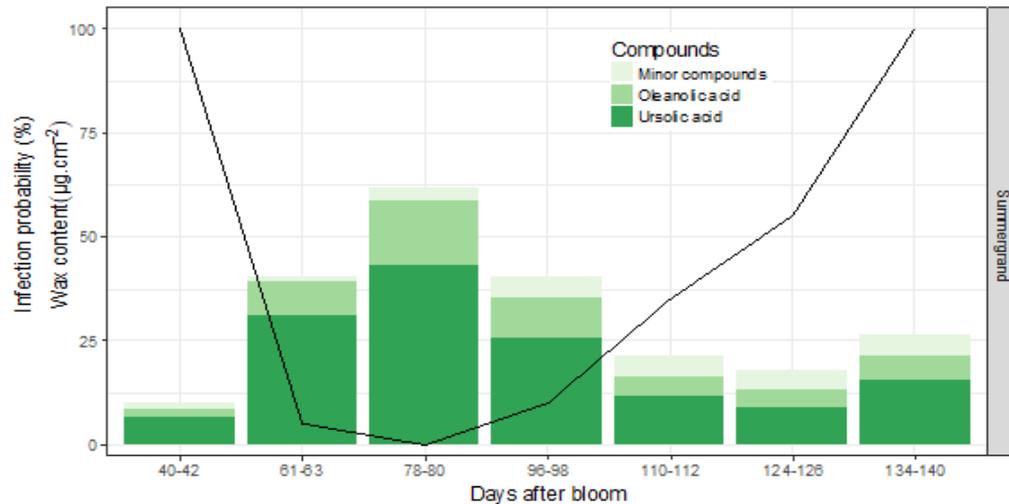
Comprendre l'interaction *Monilia*-pêcher pour créer des variétés de Pêcher résistantes.

Introduction: travaux antérieurs

- Etude de la **résistance** au cours du **développement du fruit**
- ainsi que l'**évolution** de la **composition biochimique** de l'épiderme.



- **Des corrélations entre la probabilité d'infection et des composés (phénoliques, terpénoïdes et dérivés)**



L. Oliveira Lino, thèse 2014-2016

Introduction: travaux antérieurs

Contexte

Introduction

Objectifs

1^{ère} approche

2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

- Exploration de la **diversité** de la **résistance** à la pourriture brune dans les **ressources génétiques** du Pêcher,
- ainsi que la **diversité** de la **composition biochimique** de l'épiderme du fruit

250 génotypes étudiés x 2 années (population interspécifique et collection)

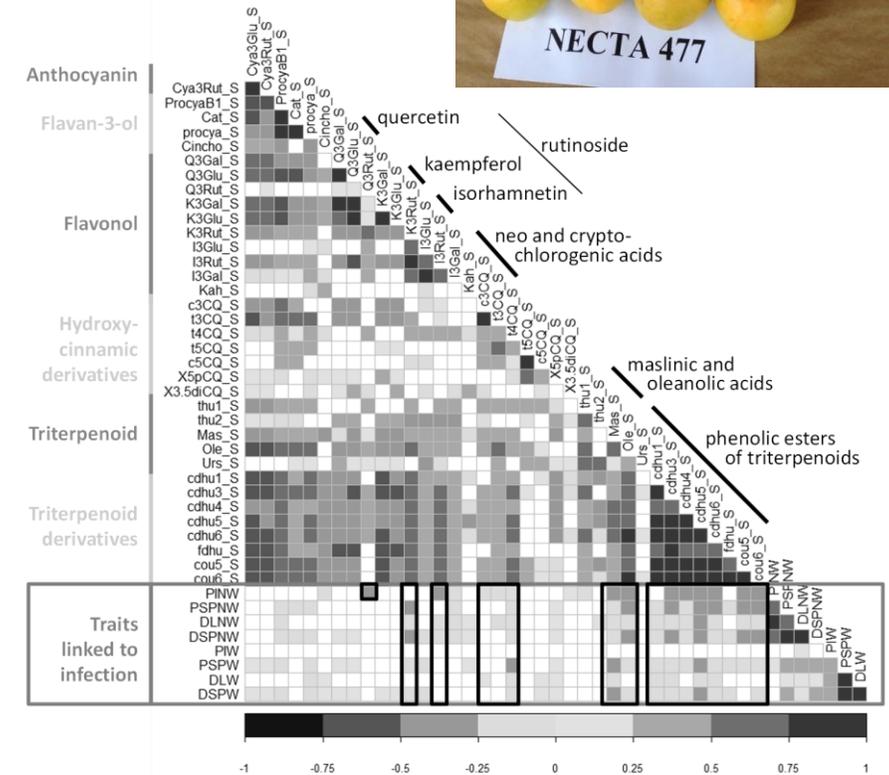
- Infections contrôlées en laboratoire et au verger (8 paramètres)
- Profil des principaux métabolites spécialisés de l'épiderme (43 composés),
- Analyses statistiques

➤ **Des corrélations entre des traits d'infection et des composés (phénoliques, terpénoïdes et dérivés)**

L. Oliveira Lino, thèse 2014-2016

S. Scariotto, thèse 2018

Oliveira Lino et al, JXB 2020



Introduction: littérature

Contexte

Introduction

Objectifs

1^{ère} approche

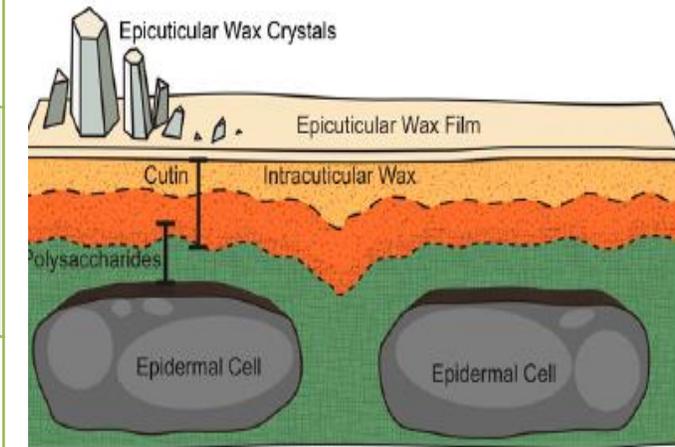
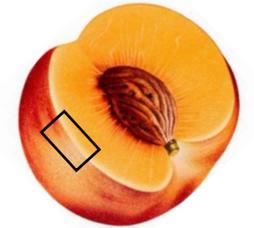
2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

Effets des composés de l'épiderme dans les infections fongiques

Groupes	Compounds	Pathogen and plant host	References
Phenolic derivatives	methyl p-coumarate methyl caffeate syringic acid	mold fungi on sorghum grain	Shaik et al, 2016
Hydroxycinnamic derivatives	chlorogenic and caffeic acids	<i>M. Fructicola</i> peach	Gradziel & Wang, 1993 Lee & Bostock, 2007
Triterpenoids	ursolic acid, oleanolic acid,	<i>Venturia inaequalis</i> apple	Picinelli et al, 1995
		<i>Penicillium</i> orange	Mahlo & Eloff, 2014
	ursolic acid, oleanolic acid,	mold fungi on sorghum grain	Shaik et al, 2016
		<i>M. Laxa</i> peach	Oliveira Lino et al, 2020
Waxes	cuticular lipids hexacosanal	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> avocado	Podia et al, 1993
		<i>Blumeria graminis</i> (powdery mildew) barley	Zabka et al 2007, Hansjakob et al 2010
	wax extracted	<i>Alternaria alternata</i> Pear	Li et al, 2013

Effet inducteur ou reconnaissance
Effet inhibiteur



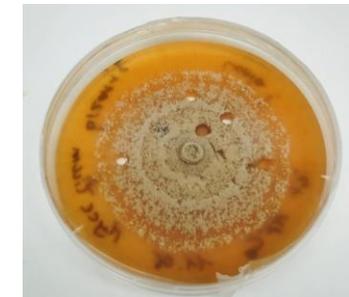
Objectif des stages M2: *Tests in-vitro*

➤ **OBJECTIF: évaluer par des tests *in vitro* l'effet fongicide de ces composés sur le champignon**

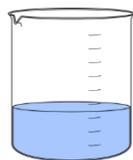
- Des molécules pures lorsque disponibles dans le commerce,



- 2 souches de champignon entretenues au laboratoire: *M. Laxa*, *M. Fructicola*



- Des extraits naturels de surface de fruits



Des mises au point de protocoles nécessaires
Réalisation des tests avec des répétitions
Analyse statistique

Objectif des stages M2: *Tests in-vitro*

Contexte

Introduction

Objectifs

1^{ère} approche

2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

11 composés purs identifiés

8 Composés phénoliques

3 Triterpénoïdes

Molécules synthétiques disponibles dans le commerce

Composés
hydrophiles

Composés phénoliques:

Catéchine, épicatechine, acide chlorogénique, acide caféique, acide férulique, cyanidine-3-glucoside, quercetine-3-glucoside, quercetine-3-rutinoside

Composés
hydrophobes

Triterpénoïdes:

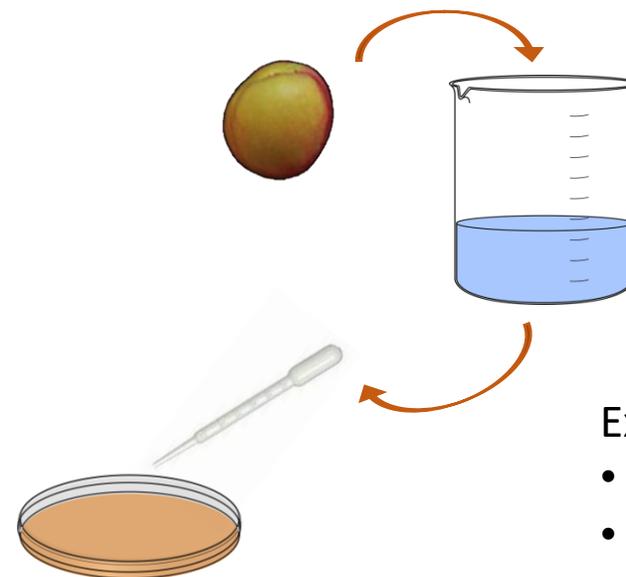
Acide oléanolique, acide maslinique, acide bétulinique

Evaluer des extraits naturels de Pêche



Stade Sensible

Stade Résistant



2 types de protocoles:

Molécules hydrophiles, incorporées dans le milieu

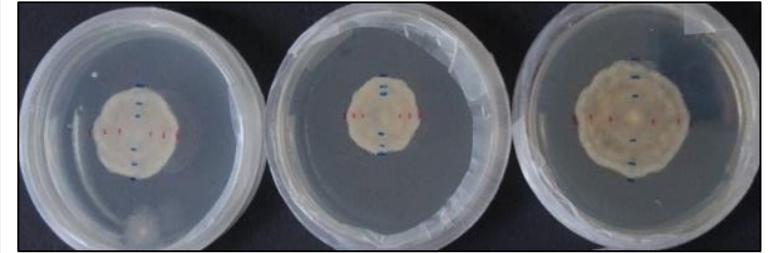
Molécules hydrophobes, déposées en surface du milieu

1^{ère} approche

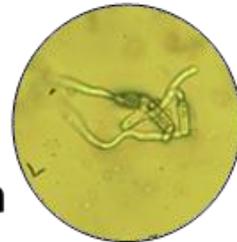
Tester l'effet sur la croissance du champignon

- Développement mycélien (taille de la colonie)
- Sporulation (quantification des spores produites)
- Germination (% de spores germées)

Mesure du diamètre pendant 7 jours



Développement mycélien



Germination

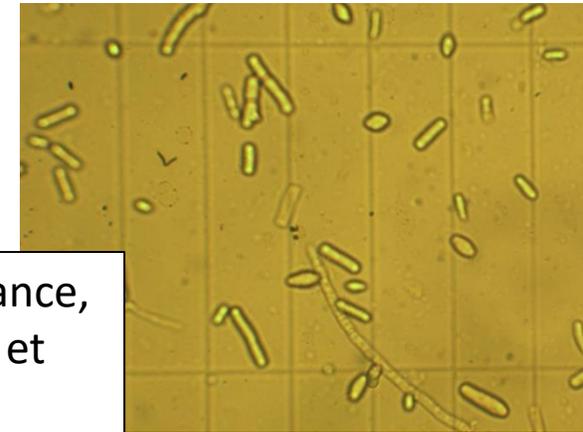


La solution de spores est inoculée sur un milieu. Après 24H, comptage des spores germées au microscope



Sporulation

Après 10 jours de croissance, récupération des spores et comptage à la cellule de Malassez sous microscope



Stage M2 - 2018, L. Latchoumane

Contexte

Introduction

Objectifs

1^{ère} approche

2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

1^{ère} approche

Contexte

Introduction

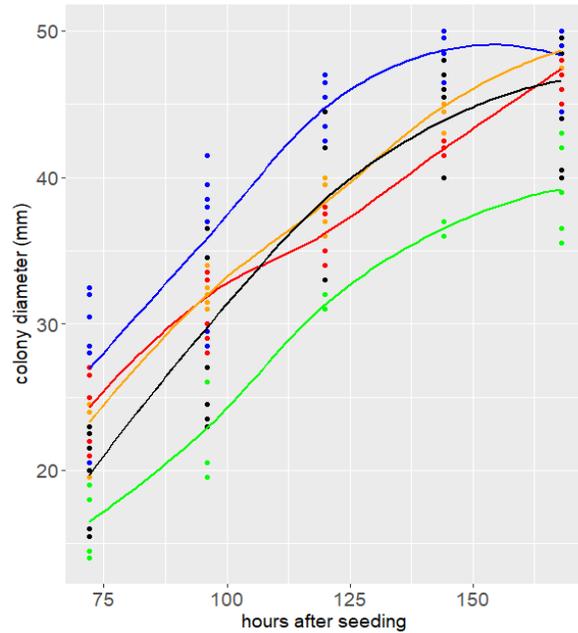
Objectifs

1^{ère} approche

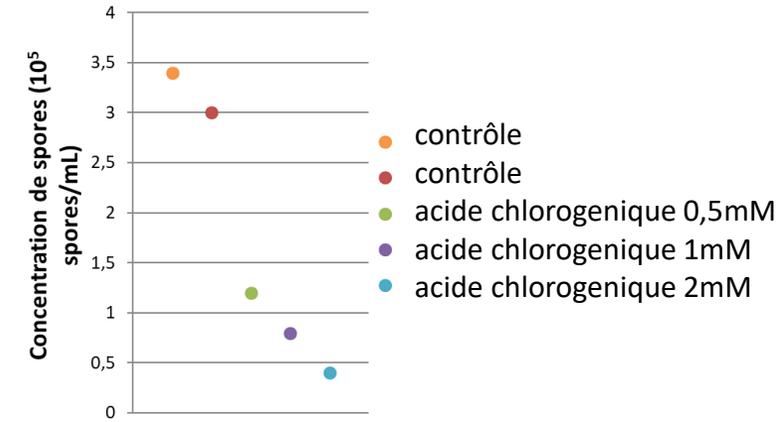
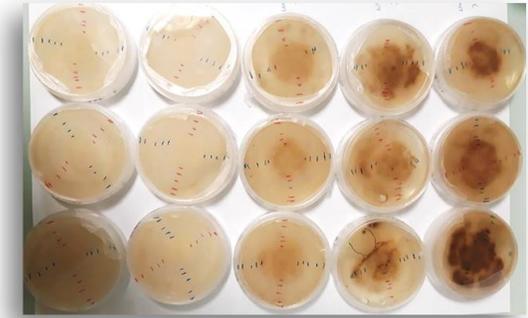
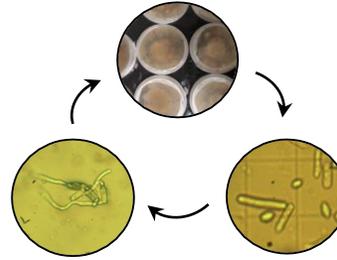
2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

Tester l'effet sur la croissance du champignon



- acide caféique
- acide chlorogénique
- acide ferulique
- catéchine
- contrôle



Effet de l'acide chlorogénique sur la sporulation

Pas de toxicité

Des effets différents suivant les composés: des composés inhibiteurs, des composés activateurs de la croissance, Des effets plus ou moins intéressants sur la sporulation et la capacité germinative

2^{ème} approche

Contexte

Introduction

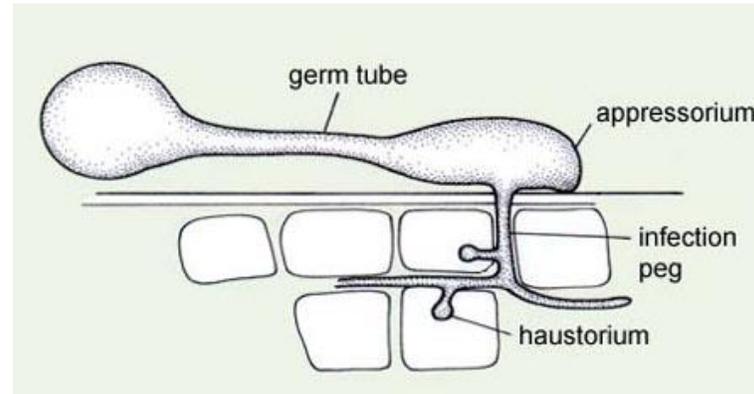
Objectifs

1^{ère} approche

2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

Tester l'effet sur d'autres facteurs de pathogénicité du champignon:
sur la production des enzymes nécessaires à la pénétration dans le fruit



CIV:
Culture en milieu liquide
pour obtention du
sécrétome

Biochimie:
Dosage des protéines
Analyse protéomique

Biologie moléculaire:
Extraction d'ARN
Analyse des gènes exprimés

Des mises au point de protocoles nécessaires
Une molécule: l'acide Chlorogénique (ou acide caféoylquinique (ACQ))
Une espèce: *Monilia Fructicola*

Stages M2- 2019-20, C. Saccaram, A. Lemozy

Rencontres du GIS Fruits - 28 octobre 2020

2^{ème} approche

Tester l'effet sur d'autres facteurs de pathogénicité du champignon:
sur la production des enzymes nécessaires à la pénétration dans le fruit

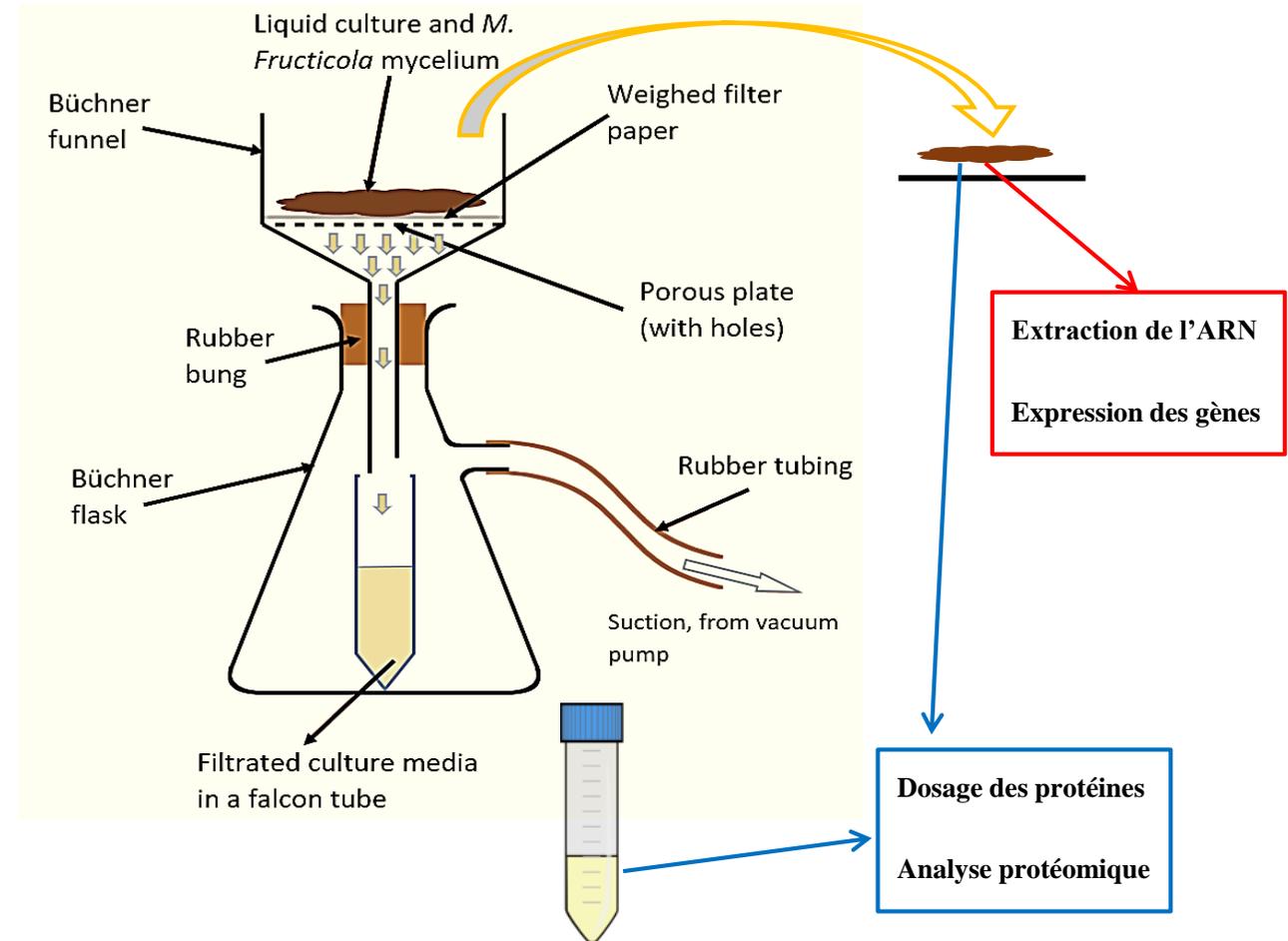


+13 jours



Milieux de culture:

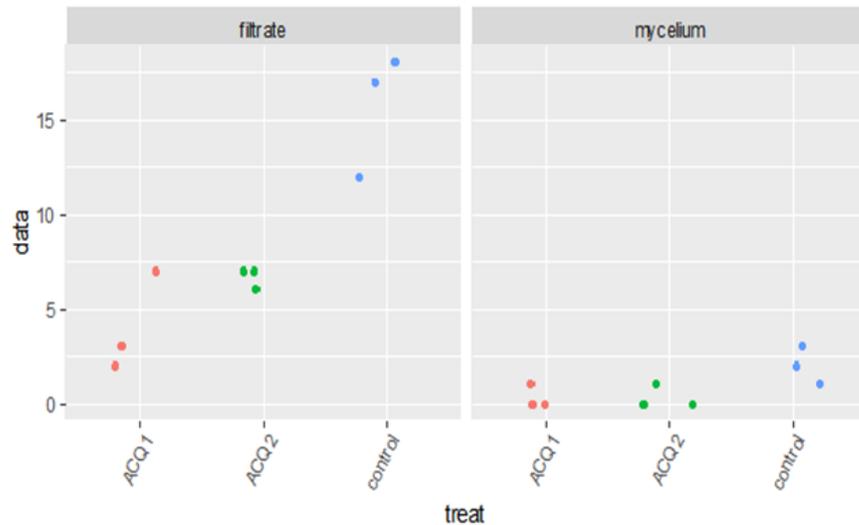
- additionné en ACQ
- contrôle



2^{ème} approche

Tester l'effet sur d'autres facteurs de pathogénicité du champignon:
sur la production des enzymes nécessaires à la pénétration dans le fruit

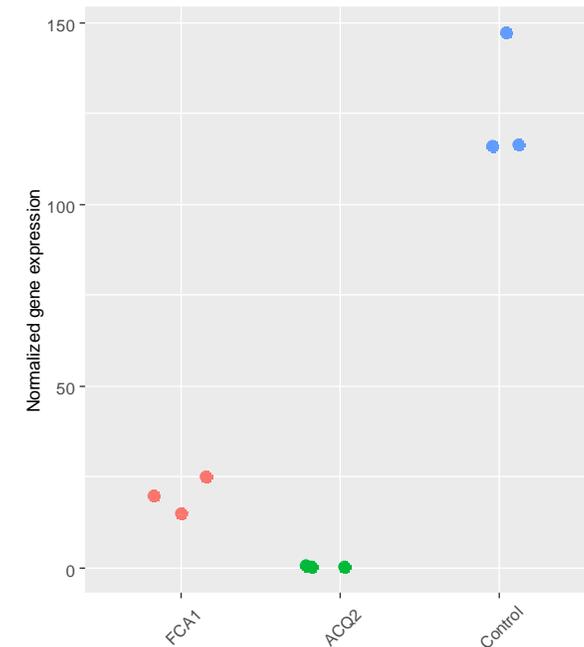
Teneur en cutinase dans le filtrat et dans le mycélium



ACQ diminue la production de cutinase

➤ 172 protéines spécifiques au sécrétome

Expression du gène *MfCut1*



ACQ diminue l'expression du gène *MfCut1*

➤ 3 autres gènes de dégradation de l'épiderme étudiés *MfPG1*, *MfPG3*, *MfPG6*

Stages M2- 2019-20, C. Saccaram, A. Lemozy

Conclusions et Perspectives

Contexte

Introduction

Objectifs

1^{ère} approche

2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

- Les protocoles développés (culture en milieu liquide pour obtention du sécrétome) permettent l'extension possible à l'étude d'autres composés
- Des protocoles sont encore en développement concernant les molécules hydrophobes et les extraits naturels de fruits
- L'expression de gènes de *Monilia* va être poursuivie, suite aux résultats de protéomique et par la recherche d'homologie avec des gènes de virulence connus dans d'autres espèces de champignon de la famille des *Sclerotiniaceae*

Pas de toxicité directe des composés testés

Les composés affectent différentes fonctions du champignon:

L'acide chlorogénique favorise le développement du mycélium mais diminue la sporulation

L'acide chlorogénique diminue la production des enzymes nécessaires à la pénétration dans le fruit.

Conclusions et Perspectives

Contexte

Introduction

Objectifs

1^{ère} approche

2^{ème} approche

Conclusions et perspectives

L'acide chlorogénique et ses isomères sont les composés majeurs de l'épiderme.

Les résultats montrent qu'ils pourraient limiter la propagation de la maladie en réduisant l'inoculum dans le verger (moindre capacité à produire des spores), en diminuant la pénétration dans les fruits (blocage de la production des enzymes de dégradation de l'épiderme)

Prise en compte dans les programmes d'amélioration variétale pour la résistance à la pourriture brune et de création de variétés cumulant des résistances aux autres maladies du pêcher

Création de descendances intégrant:

- les génotypes présentant:
 - les meilleurs niveaux de résistance aux tests de phénotypage,
 - des fortes teneurs pour les composés de l'épiderme identifiés,
- des génotypes résistants du Brésil et des USA ainsi que *Prunus Davidiana*

Remerciements



Au GIS Fruits pour le financement des 3 stages de M2
des étudiants:

Lorraine Latchoumane (2018)
Chandrodhay Saccaram (2019)
Arthur Lemozy (2020)

Aux partenaires: GRAB et Terralia

A la plateforme de protéomique ProGenomix (CEA-INRAE-Li2D):
Jean Armengaud

Aux collègues de Pathologie Végétale INRAE PACA:
P. Nicot, C. Troulet, M. Duffaud

Aux collègues de INRAE GAFL:

Bénédicte Quilot-Turion
Laure Heurtevin
Véronique Signoret
Léandro Oliveira Lino (doc 2014-2016)
Silvia Scariotto (doc 2015-2018)
Alexia Grau (stage L3 2019)
Maximiliano Dini Viñoli (doc Brésil 2018)
Majid Mustafa (doc Italie 2020)



Rencontres du GIS Fruits - 28 octobre 2020