

Caractérisation des composés organiques volatils émis par *Fusarium culmorum* et *cochliobolus sativus* en stress et étude de leur potentiel en lutte biologique

Auteur : Vangoethem, Valentine

Promoteur(s) : Jijakli, Haissam; De Clerck, Caroline

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : sciences et technologies de l'environnement, à finalité spécialisée

Année académique : 2016-2017

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/3067>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS ORGANIQUES
VOLATILS ÉMIS PAR *FUSARIUM CULMORUM* ET
COCHLIOBOLUS SATIVUS EN STRESS ET ÉTUDE DU
POTENTIEL EN LUTTE BIOLOGIQUE**

VALENTINE VANGOETHEM

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

CO-PROMOTEURS: HAISSAM JIJAKLI ET CAROLINE DE CLERCK

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique.

**CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS ORGANIQUES
VOLATILS ÉMIS PAR *FUSARIUM CULMORUM* ET
COCHLIOBOLUS SATIVUS EN STRESS ET ÉTUDE DU
POTENTIEL EN LUTTE BIOLOGIQUE**

VALENTINE VANGOETHEM

**TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER BIOINGÉNIEUR EN SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2016-2017

CO-PROMOTEURS: HAISSAM JIJAKLI ET CAROLINE DE CLERCK

RÉSUMÉ

Partant de la constatation récente que le phénomène de « *quorum sensing* » observé chez les bactéries l'était aussi pour les champignons, l'objet de l'étude a porté sur l'identification des composés organiques volatils (COVs) responsables du comportement auto-inhibiteur des champignons *Fusarium culmorum* et *Cochliobolus sativus*, agents de la pourriture racinaire des céréales. L'étude s'est articulée autour de 3 axes : identifier les composés organiques volatils émis par *F. culmorum* et *C. sativus* cultivés sur un milieu pauvre (eau gélosée), en conditions normales (potato dextrose agar) et en surpopulation (10^7 et 10^6 spores/mL), tester le bouquet de COVs de chaque traitement sur la croissance des souches elles-mêmes et enfin, tester des COVs individuellement sur la croissance des souches pour 3 concentrations (100 – 500 – 1000 μ M). Les résultats de cette étude ont montré un effet de réduction de croissance des deux souches soumises respectivement aux COVs de leur culture en conditions de surpopulation. Partant de ces résultats, l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle, l'alcool isoamylique, l'isobutanol, le longifolène le 1-pentanol, le (+)-sativène et le toluène identifiés dans ces bouquets ont été testés individuellement sur la croissance des deux souches. Pour *F. culmorum*, l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle et le 1-pentanol ont montré des effets significatifs de réduction de croissance pour les trois concentrations et l'isobutanol pour les concentrations de 500 et 1000 μ M. Pour *C. sativus*, seul le longifolène a montré des effets significatifs de réduction de croissance à 1000 μ M. Ces résultats sont prometteurs et ouvrent une perspective d'utilisation des COVs fongiques comme alternative aux pesticides conventionnels.

ABSTRACT

Based on the recent studies which showed that the « *quorum sensing* » phenomenon discovered in bacteria, was also observed in fungi, the aim of study was to identify volatile organic compounds (VOCs) which were responsible for the self-inhibition behavior of *Fusarium culmorum* and *Cochliobolus sativus* fungi causing common root rot in cereals. The study has three aims: to identify the VOCs emitted by *F. culmorum* and *C. sativus* for a growth on poor medium (solidified water), in normal conditions (potato dextrose agar) and in overpopulation (10^7 and 10^6 spores/mL), to test the effects of each blend of VOCs emitted by the fungi on their own growth and to finally test individual compounds on the growth of both fungi for three concentration (100 – 500 – 1000 μ M). The results showed a growth reduction effect on both strains when subjected to the VOCs of their culture in surpopulation. From this observation, ethyl acetate, isoamyle acetate, isobutanol, longifolene, 1-pentanol, (+)-sativene and toluene identified in these blend have been tested individually on the growth of the strains. For *F. culmorum*, ethyl acetate, isoamyle acetate and 1-pentanol have shown significant effects on growth reduction for 100 – 500 and 1000 μ M and isobutanol for 500 and 1000 μ M. For *C. sativus*, only longifolene has shown significant effect on growth reduction for 1000 μ M. These results are promising and open a perspective for the use of fungal VOCs as an alternative to conventional pesticides.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Haissam Jijakli de m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine de Gembloux et d'avoir accepté d'être mon co-promoteur.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à mon deuxième co-promoteur, Caroline De Clerck pour sa supervision tout au long de ce travail de fin d'étude, pour son investissement, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Ensuite, j'aimerais remercier les membres du personnel du Laboratoire de Phytopathologie Intégrée et Urbaine, les techniciens et les étudiants pour leur accueil et leur convivialité ainsi que pour leur disponibilité pour une aide éventuelle.

Je tiens aussi à remercier le professeur Marie-Laure Fauconnier pour m'avoir accueillie dans son Service de Chimie Générale et Organique pour mes analyses, ainsi qu'aux techniciens pour leur supervision.

Je remercie également Thierry Kenne pour son aide dans l'interprétation des résultats issus des analyses réalisées sur la machine GC-MS.

Mes remerciements vont aussi aux professeurs Catherine Charles, Marie-Laure Fauconnier et François Verheggen pour avoir accepté de faire partie de mon jury de défense.

Pour finir, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour l'aide apportée de près ou de loin et pour leur soutien.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1. Revue de la littérature.....	2
1.1. Les composés organiques volatils	2
1.1.1. Définition d'un composé organique volatil.....	2
1.1.2. Méthodes d'analyse des composés organiques volatils	3
1.1.3. Les composés organiques volatils émis par les plantes.....	5
1.1.4. Les composés organiques volatils émis par les microorganismes	7
1.2. Les composés organiques volatils émis par les champignons.....	8
1.2.1. Introduction	8
1.2.2. Intérêt et rôles des COVs émis par les champignons	9
2. Objectif de la recherche.....	14
3. Matériel et méthode.....	15
3.1. Matériel biologique	15
3.2. Traitements appliqués	16
3.3 Identification des composés organiques volatils	16
3.3.1 Culture des champignons et préparation des échantillons	16
3.3.2. Méthode d'identification des composés organiques volatils.....	18
3.3.3. Analyse et traitement des résultats	21
3.3.4. Indices de KOVATS	21
3.4. Effet des bouquets de COVs sur la croissance des champignons	22
3.4.1. Dispositif expérimental	22
3.5. Effet individuel des COVs sur la croissance des champignons	24
3.5.1. Dispositif expérimental	24
3.6. Analyse statistique.....	26
3.7. Injection de standard	26
4. Résultats et discussion.....	27

4.1. Identification des COVs émis par <i>F. culmorum</i> et <i>C. sativus</i>	27
4.1.1. Identification des composés organiques volatils émis par traitement	27
4.1.2. Comparaison des composés organiques volatils émis dans les différents traitements	47
4.1.3. Discussion	49
4.2. Effets des bouquets de COVs émis par <i>F. culmorum</i> et <i>C. sativus</i> sur leur croissance respective.....	55
4.2.1 Effets du bouquet de COVs émis par <i>F. culmorum</i> cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions normales	55
4.2.2. Effets du bouquet de COVs émis par <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions normales	57
4.2.3. Effets du bouquet de COVs émis par <i>C. sativus</i> cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de <i>C. sativus</i> cultivé en conditions normales.....	58
4.2.4. Effets du bouquet de COVs émis par <i>C. sativus</i> cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de <i>C. sativus</i> cultivé en conditions normales	59
4.2.5. Discussion	60
4.3. Effets individuels des composés organiques volatils	61
4.3.1. Effets des COVs sur <i>F. culmorum</i>	62
4.3.2. Effets des COVs sur <i>C. sativus</i>	68
4.3.3 Discussion	73
CONCLUSIONS	77
PERSPECTIVES	78
RÉFÉRENCES	80
ANNEXE I - Code Matlab® des traitements de données des fichiers de sortie du GC-MS ...	90
ANNEXE II : Comparaison des méthodes d'analyse du GC-MS avant et après la panne du 3 avril 2017.....	94

Liste des figures et tableaux

Figure 1 - Principe de la technique SPME. A. Appareil de collecte déboîtée : fibre collectrice (a), aiguille creuse (b), piston (c). B. Adsorption des molécules volatiles contenues dans l'eau ou l'air sur la phase qui enduit la fibre. C. Molécules adsorbées sur la fibre. (Cassier et al. 2000).....	4
Figure 2 - Représentation des interactions de la plante avec son environnement (Dudareva et al., 2006).....	6
Figure 3 – Spores de <i>F. culmorum</i> (A) et <i>C. sativus</i> (B) observées au microscope optique. Echelle : 40µm.	15
Figure 4 - Représentation des échantillons pour <i>F. culmorum</i> sous conditions de surpopulation à 7 jours de croissance.....	18
Figure 5 - Représentation de l'étape de prélèvement par micro-extraction sur phase solide...	19
Figure 6 - Machine de chromatographie sur phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. La flèche rouge désigne le lieu de l'insertion de la fibre SPME.	20
Figure 7 - Dispositif expérimental pour l'étude des effets des bouquets de COVs émis par <i>F. culmorum</i> ou <i>C. sativus</i> en situation de stress sur la croissance des champignons eux-mêmes.	22
Figure 8 - Représentation schématique de la croissance du champignon en conditions normales sous l'effet des COVs émis par le champignon en situation de stress.....	23
Figure 9 - Disque de mycélium de 5 mm de diamètre pris dans une boîte de culture de <i>C. sativus</i>	23
Figure 10 - Dispositif permettant l'étalement de la suspension de spores sur l'ensemble de la surface du milieu contenu dans les flasques réalisé à l'aide de deux râpeaux mis bout à bout.	24
Figure 11 - Dispositif expérimental utilisé pour tester les COVs individuellement sur la croissance de <i>F. culmorum</i> et <i>C. sativus</i>	25
Figure 12- Chromatogrammes des COVs émis par <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions normales à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.	28
Figure 13 - Chromatogrammes des COVs émis par <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.	33
Figure 14 - Chromatogrammes des COVs émis par <i>C. sativus</i> cultivé en milieu pauvre à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.....	35
Figure 15 - Chromatogrammes des COVs émis par <i>C. sativus</i> cultivé en conditions normales à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.....	38

Figure 16 - Chromatogrammes des COVs émis par <i>C. sativus</i> cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.	39
Figure 17 - Comparaison entre traitements du nombre de COVs émis par <i>F. culmorum</i> à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance ; et par <i>C. sativus</i> à 7 jours (C) et 14 jours (D) de croissance.	48
Figure 18 - Effets du bouquet de COVs émis par <i>F. culmorum</i> (FC) cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions normales. A. Photo des effets au 7ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> au cours du temps.	56
Figure 19 - Effets du bouquet de COVs émis par <i>F. culmorum</i> (FC) cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions normales. A. Photo des effets au 7ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> au cours du temps.	57
Figure 20 - Effets du bouquet de COVs émis par <i>C. sativus</i> (CS) cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de <i>C. sativus</i> cultivé en conditions normales. A. Photo des effets au 13ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>C. sativus</i> au cours du temps.	58
Figure 21 - Effets du bouquet de COVs émis par <i>C. sativus</i> (CS) cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de <i>C. sativus</i> cultivé en conditions normales. A. Photo des effets au 14ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>C. sativus</i> au cours du temps.	59
Figure 22 - Effets de l'acétate d'éthyle sur la croissance de <i>F. culmorum</i> . A. Photo des effets au 6ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> au cours du temps.	62
Figure 23 - Effets de l'acétate d'isoamyle sur la croissance de <i>F. culmorum</i> . A. Photo des effets au 7ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> au cours du temps.	63
Figure 24 - Effets de l'alcool isoamylique sur la croissance de <i>F. culmorum</i> . A. Photo des effets au 7ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> au cours du temps.	64
Figure 25 - Effets de l'isobutanol sur la croissance de <i>F. culmorum</i> . A. Photo des effets au 7ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> au cours du temps..	65
Figure 26- Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> sous les effets du 1-pentanol au cours du temps ; * différences significatives (P=0,05) entre le traitement et le contrôle ; Barres d'erreur = écarts-types ; N=4	66

Figure 27 - Effets du toluène sur la croissance de <i>F. culmorum</i> . A. Photo des effets au 7ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>F. culmorum</i> au cours du temps.....	67
Figure 28 - Effets de l'acétate d'éthyle sur la croissance de <i>C. sativus</i> . A. Photo des effets au 14ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>C. sativus</i> au cours du temps.....	68
Figure 29 - Effets de l'alcool isoamylique sur la croissance de <i>C. sativus</i> . A. Photo des effets au 14ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>C. sativus</i> au cours du temps.....	69
Figure 30 - Effets de l'isobutanol sur la croissance de <i>C. sativus</i> . A. Photo des effets au 14ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>C. sativus</i> au cours du temps.	70
Figure 31 - Effets du longifolène sur la croissance de <i>C. sativus</i> . A. Photo des effets au 13ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>C. sativus</i> au cours du temps.	71
Figure 32 - Effets du (+)-sativène sur la croissance de <i>C. sativus</i> . A. Photo des effets au 14ème jour de croissance. B. Graphique des croissances de <i>C. sativus</i> au cours du temps.....	72
Tableau 1 - Liste des COVs émis par <i>F. culmorum</i> cultivé en milieu pauvre à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.....	27
Tableau 2 - Liste des COVs émis par <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions normales à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.	29
Tableau 3 - Liste des COVs émis par <i>F. culmorum</i> cultivé en conditions de surpopulation à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.	31
Tableau 4 - Liste des COVs émis par <i>C. sativus</i> cultivé en milieu pauvre à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.....	34
Tableau 5 - Liste des COVs émis par <i>C. sativus</i> en conditions normales à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.....	36
Tableau 6 - Liste des COVs émis par <i>C. sativus</i> en conditions de surpopulation à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.	40
Tableau 7 - Synthèse des COVs identifiés pour <i>F. culmorum</i> et <i>C. sativus</i> cultivé en milieu pauvre, en conditions normales et en surpopulation à 7 et 14 jours et calcul des indices de Kovats.....	43
Tableau 8 – Liste des composés testés individuellement sur la croissance de <i>F. culmorum</i> et <i>C. sativus</i>	61
Tableau 9 - Synthèse des effets individuels des COVs sur la croissance de <i>F. culmorum</i> et <i>C. sativus</i>	73

Liste des acronymes, des symboles et des sigles et lexique

CAS	Chemical Abstract Service
COVs	Composés organiques volatils
CS	<i>Cochliobolus sativus</i>
FC	<i>Fusarium culmorum</i>
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse
ICOVs	Composés organiques volatils induits
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MS	masse spectrale
mVOC	Composés organiques volatils microbiens
PRPB	Programme de Réduction des Pesticides et des Biocides
QC	<i>quorum sensing</i>
RI	Temps de rétention
STD	Standard

INTRODUCTION

La production de céréales en Belgique était d'un peu plus de 3 millions de tonnes en 2014 (FAOSTAT, 2017). Cette culture importante est néanmoins sujette à d'importantes pertes de rendement liées notamment à des maladies fongiques. À titre d'exemple, l'orge peut être infecté par des pathogènes provoquant la pourriture racinaire qui engendre des pertes pouvant atteindre 33 % pour les variétés les plus sensibles (Karov et al., 2009). Pour contrer ces pertes, l'emploi de pesticides chimiques s'avère très efficace et indispensable pour le moment.

Cependant, en 2005, le premier Programme de Réduction des Pesticides et des Biocides (PRPB) en Belgique a été mis en place (Service Public Fédéral Belge, 2015). En 2013, il a pointé la Belgique, comme le cinquième plus gros consommateur de pesticides des pays membres de l'Union Européenne. Depuis lors, les limitations d'utilisation de substances actives ne cessent d'augmenter et l'interdiction de nombreux pesticides chimiques obligent les chercheurs à développer de nouveaux produits car les méthodes de lutte biologique traditionnelles ne fonctionnent plus.

Plusieurs études se sont donc penchées sur le potentiel éventuel des COVs microbiens comme agents de biocontrôle (Stoppacher et al., 2010; Kanchiswamy et al., 2015a; Li et al., 2016; Gu et al., 2017). Au vu des résultats positifs, les COVs microbiens se présentent comme une alternative prometteuse aux pesticides chimiques.

De plus, des études ont montré que certains pathogènes peuvent émettre des COVs qui, dans certaines conditions, inhibent leur propre développement comme dans les conditions d'une densité de population élevée. C'est le cas de *Cladosporium cucumerinum*, pathogène des cucurbitacées, dont la germination de ses spores est fonction de leur densité (Aver'Yanov et al., 2011).

C'est pourquoi notre étude se penche sur le potentiel en lutte biologique des COVs émis par deux pathogènes provoquant la pourriture racinaire des céréales : *Fusarium culmorum* et *Cochliobolus sativus*. Ces deux pathogènes s'attaquent aussi bien aux semences qu'aux racines des plantes. L'infection est visible par la présence de lésions brunes pouvant s'étendre en lésions nécrotiques et provoquer un ralentissement du développement voire la mort du semis (Fiers et al., 2013).

1. Revue de la littérature

1.1. Les composés organiques volatils

1.1.1. Définition d'un composé organique volatil

La communauté scientifique définit un composé organique volatil par un ensemble de propriétés. Pour être défini comme un COV, ce dernier doit être un composé organique, de faible poids moléculaire, de pression de vapeur assez élevée pour être vaporisé et entrer en phase gazeuse à des températures et des pressions atmosphériques normales (Dicke et al., 2010; Hung et al., 2015). Les COVs possèdent aussi généralement une solubilité dans l'eau faible et une odeur distincte (Herrmann, 2011).

L'origine des COVs peut être anthropique ou biologique (Baghi, 2013). Les COVs naturels sont des métabolites secondaires émis principalement par les plantes mais aussi par les insectes et les microorganismes. L'ensemble des émissions naturelles approche les 90% des émissions totales des COVs (PACA, 2017).

Les COVs anthropiques sont sujets à débat. De nombreuses études montrent les effets néfastes de ces composés sur la santé et sur l'environnement, comme les problèmes de respiration causés par les aérosols présents dans l'atmosphère (McNeill, 2017) ou les effets des polluants du pétrole sur la croissance des poissons (Cherr et al., 2017).

C'est pourquoi deux autres définitions ont été établies par la Commission Européenne dans la mise en place de leur stratégie pour la réduction des émissions de COVs par l'industrie.

Selon la directive 1999/13/CE, un composé repris dans la catégorie des composés organiques volatils est « tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières ». Quant à elle, la directive 2004/42/CE définit le composé organique volatil comme « tout composé organique dont le point d'ébullition initial, mesuré à la pression standard de 101,3 kPa, est inférieur ou égal à 250 °C ». Cette dernière définition a été privilégiée lors des négociations, car le point d'ébullition est plus facile à identifier que la pression de vapeur à température ambiante pour une même substance. Néanmoins, la Commission Européenne soutient que les résultats selon l'une ou l'autre approche restent semblables.

1.1.2. Méthodes d'analyse des composés organiques volatils

Les étapes de collecte, séparation, identification et quantification sont des étapes indispensables dans l'analyse des COVs. Une des méthodes de collecte des COVs parmi les plus usitées, particulièrement pour les microorganismes, est la micro-extraction sur phase solide (SPME). Elle est considérée comme une des plus brillantes inventions dans le domaine de préparation d'échantillons. En effet, cette technique est mobile et combine en une seule étape la collecte, la concentration et l'introduction des COVs, ce qui réduit considérablement le temps de préparation et augmente la sensibilité par rapport aux autres méthodes d'extraction (Zhang et al., 2010). De nombreuses études récentes utilisent la méthode SPME pour collecter des COVs émis par la décomposition d'aliments, d'huiles essentielles, de plantes ou encore des sols (Koziel et al., 2017; Mitropoulou et al., 2017; Raza et al., 2017; Souza Silva et al., 2017).

Le principe de fonctionnement de la méthode SPME est l'introduction d'une fibre, recouverte d'une phase adsorbante, dans l'enceinte d'un flacon fermé contenant le sujet étudié. Cette fibre est contenue dans une aiguille et est insérée dans l'enceinte à l'aide d'une seringue. Le flacon utilisé possède un couvercle muni d'un septum permettant la pénétration de l'aiguille. Une fois à l'intérieur, la fibre est libérée par un système de piston (Figure 1). Les molécules dans l'atmosphère du flacon viennent alors s'adsorber sur la fibre pendant un temps déterminé selon la nature du matériel étudié. (Cassier et al., 2000)

L'avantage de cette méthode est qu'elle se réalise dans un système statique à opposition d'un système dynamique, ce qui supprime le besoin d'un solvant pour concentrer les molécules. En effet, dans les méthodes dynamiques de collecte de COVs, appelées « purge and trap », les volatiles sont capturés à l'aide d'un gaz vecteur dans une cartouche. Les composés piégés doivent ensuite être concentrés dans un solvant pour pouvoir être analysés. De plus, l'utilisation d'un solvant pourrait engendrer la perte de composés présents en faible concentration au moment de l'élimination du solvant. (Cassier et al., 2000)

Toutefois, la méthode SPME utilise des fibres qui possèdent une plus ou moins grande affinité pour certains composés, ce qui empêche la découverte de nouvelles molécules (Hung et al., 2015). La méthode SPME n'est pas considérée comme une méthode quantitative car le temps d'adsorption, la saturation et l'affinité de la fibre influencent le type et la quantité des composés obtenus (Vas et al., 2004). Toutefois, elle permet d'avoir une idée des composés majoritaires en prenant en compte toutes les précautions nécessaires lors de l'interprétation.

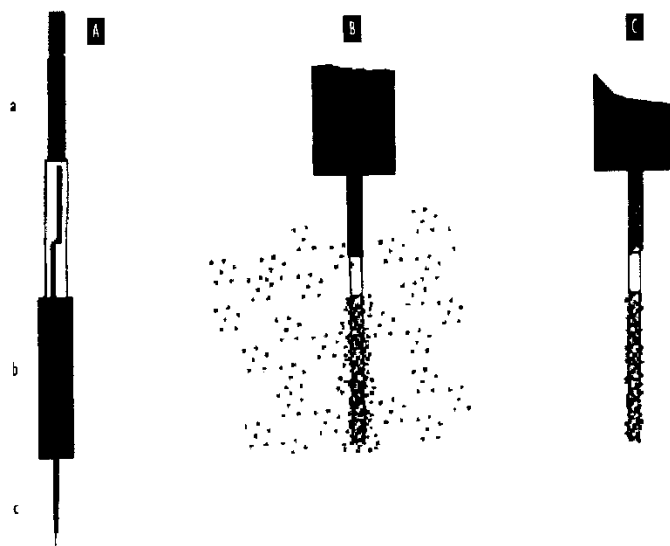


Figure 1 - Principe de la technique SPME. **A.** Appareil de collecte déboîtée : fibre collectrice (a), aiguille creuse (b), piston (c). **B.** Adsorption des molécules volatiles contenues dans l'eau ou l'air sur la phase qui enduit la fibre. **C.** Molécules adsorbées sur la fibre. (Cassier et al. 2000)

Pour l'étape d'analyse, la méthode la plus utilisée actuellement est la chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS). Elle est connue pour être la méthode analytique la plus puissante pour les COVs d'origine biologique (Zhang et al., 2010). Cette méthode combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse qui permet la séparation des composés et les performances de la spectrométrie de masse qui permet la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Ce couplage permet d'identifier et/ou de quantifier de manière précise les composés présents en très faible concentration, même à l'état de traces. La GC-MS est fiable et abordable d'un point de vue économique (Cassier et al., 2000; Hung et al., 2015). Cette méthode est utilisée dans de nombreuses études récentes pour analyser des COVs de plantes, de l'air, des huiles essentielles ou encore des traitements des eaux. (Korkmaz et al., 2017; Maceira et al., 2017; Mitropoulou et al., 2017; Barik et al., 2018).

Les étapes de fonctionnement de la GC-MS consistent d'abord en l'injection des composés dans une phase stationnaire où un gaz porteur va transporter et séparer les molécules selon leurs propriétés chimiques le long de la colonne. Ensuite, les molécules sont ionisées et leur spectre de masse est déterminé. Enfin, les composés sont identifiés en utilisant une librairie, (base de données des spectres de masse) ou en comparant les temps de rétentions avec les spectres des standards connus. (Cassier et al., 2000; Morath et al., 2012)

1.1.3. Les composés organiques volatils émis par les plantes

Les plantes génèrent une quantité importante de produits naturels leur permettant d'interagir avec l'environnement (Spinelli et al., 2011). En effet, à cause ou grâce à leur sédentarité, les plantes ont dû développer des techniques de survie différentes de celles rencontrées chez les êtres vivants mobiles (Regnault-Roger, 2005). C'est donc au moyen des COVs qu'elles ont développé leur système de communication et en ont fait par la même occasion leur arme de défense (Holopainen et al., 2012).

Les COVs émis par les plantes représentent 1% des métabolites secondaires connus des plantes et, à ce jour, pas moins de 1700 COVs émis par 90 familles de plantes ont été isolés et identifiés (Theis et al., 2003; Dudareva et al., 2006; Dicke et al., 2010). Parmi ces composés, ce sont les isoprènes, les terpènes et les volatils à notes vertes à 6 carbones qui dominent (Holopainen et al., 2010). Holopainen et al. (2010) montrent aussi que le type de COVs émis varie fortement selon l'espèce végétale, l'organe en jeu, l'étape de développement et les conditions environnementales.

Les composés organiques volatils peuvent être émis de deux manières : une émission en continu, comme le font les plantes aromatiques par exemple, ou une émission uniquement lorsqu'un stimulus spécifique est perçu par la plante (Paré et al., 2005). Il existe deux types de stimuli, aussi appelés stress : le stress biotique créé par le monde du vivant (insectes, champignons, animaux,...) et le stress abiotique généré par le monde environnant (le climat, la température, l'humidité,...). Dans le cas d'un stimulus, les COVs sont appelés composés organiques volatils induits (ICOVs) et peuvent être émis des heures ou des jours après le stress (Paré et al., 1997). Les ICOVs émis sont, quant à eux, principalement des alcènes, alcanes, acides carboxyliques, composés azotés et alcools (Holopainen et al., 2010).

Les ICOVs sont donc produits uniquement après des inductions biotiques et abiotiques (Spinelli et al., 2011). Toutefois, Vuorinen et al., (2004) montrent qu'un COV émis en continu par des plantes saines et intactes peut se transformer en COV inducteur après un dommage foliaire par exemple.

Les processus et voies de biosynthèse des COVs chez les plantes sont nombreux, et leurs mécanismes sont bien connus des scientifiques (Ueda et al., 2011; Gupta et al., 2012; Kanchiswamy et al., 2015b; Tan et al., 2016). Par contre, les connaissances sur la manière dont les végétaux détectent les COVs restent encore limitées (Holopainen et al., 2012). Ces signaux sont impliqués dans une grande partie de leurs fonctions écologiques et jouent un rôle important dans la communication inter et intra spécifique. En effet, les COVs sont impliqués

dans de nombreuses interactions plante-plante, plante-insecte ou encore plante-microorganisme. Leur action se retrouve aussi bien au-dessus qu'en dessous du sol (Morath et al., 2012) (Figure 2).

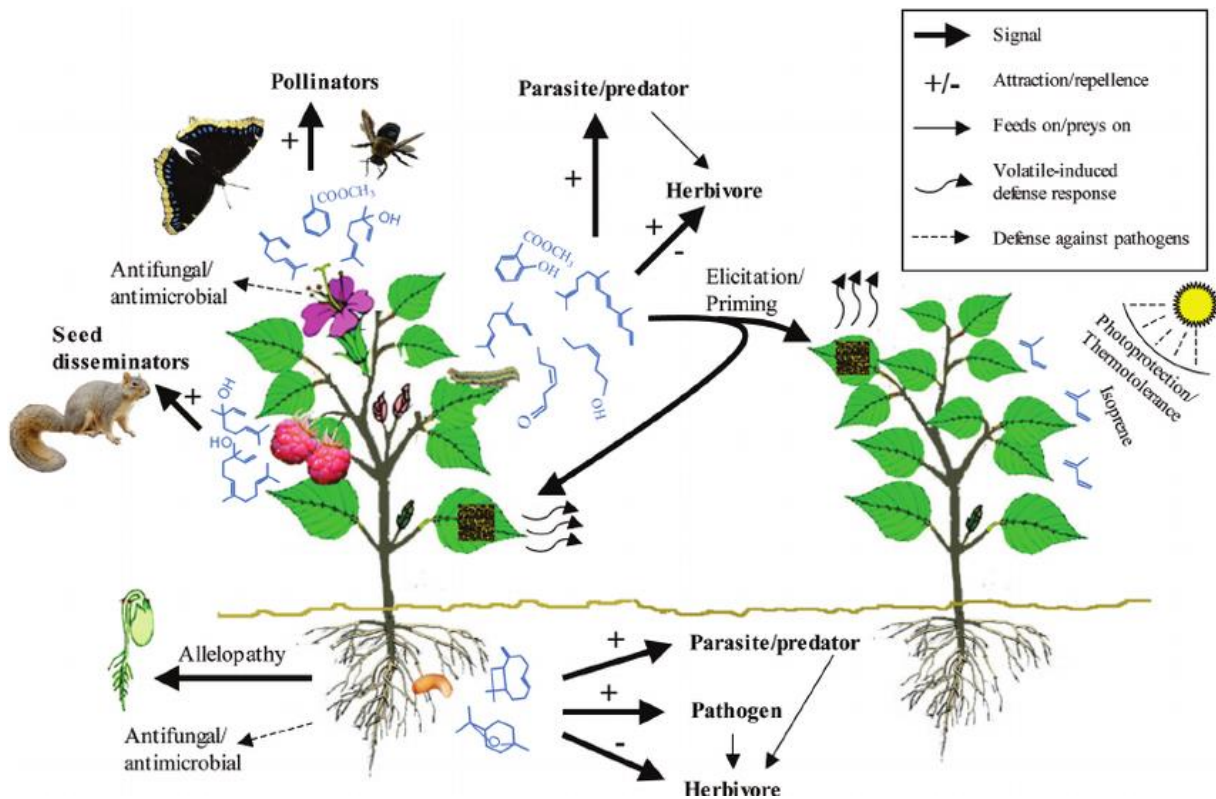


Figure 2 - Représentation des interactions de la plante avec son environnement (Dudareva et al., 2006).

Dans les interactions plante-plante, les COVs permettent la communication entre elles. Par exemple, les COVs émis par une plante endommagée signalent le danger aux plantes voisines, qui vont alors activer leurs défenses (Blande et al., 2010). Dans les interactions plante-insecte, les plantes peuvent émettre des COVs qui attirent des insectes spécifiques, soit pour se nourrir, comme le montre l'étude de Kreuzwieser et al. (2014) sur les COVs émis par la plante *Dionée attrape-mouche*, soit pour se défendre contre un herbivore comme le montrent Verheggen et al. (2005) avec l'étude de la perception des COVs émis par des plants de tomate infestés par des pucerons par le syrpe, ennemi naturel de ces insectes. Enfin, dans les interactions plante-microorganisme, les plantes peuvent émettre des COVs contre des pathogènes. À titre d'exemple, les études de Kaddes et al. (2015, 2016) montrent que l'orge émet des COVs qui inhibent la croissance des pathogènes tels que *Fusarium culmorum* et *Cochliobolus sativus*. Quintana-Rodriguez et al. (2015), quant à eux, démontrent que le

haricot commun émet des COVs qui lui permettent d'augmenter sa résistance au pathogène *Colletotrichum lidemuthianum*.

Les COVs jouent aussi un rôle dans le mécanisme de réponse à des stress abiotiques notamment dans le cadre de dégâts foliaires, d'une variation de température, d'intensité lumineuse, d'humidité et autres facteurs abiotiques de l'environnement comme le montrent Spinelli et al., (2011). Dans ce contexte, l'éthylène agit principalement comme messager du stress qui permet aux plantes de déclencher leurs défenses.

Les COVs émis par les plantes et les insectes sont répertoriés dans la base de données Phérobase ("The Pherobase," n.d.). Cette dernière se consacre aux composés de types phéromones et sémiochimiques.

1.1.4. Les composés organiques volatils émis par les microorganismes

Les études sur les émissions de composés organiques volatils microbiens (mVOCs) sont largement moins nombreuses que celles sur les émissions de COVs des plantes. Leurs fonctions écologiques sont diverses et peu connues. Comme pour les COVs des plantes, les mVOCs sont utilisés dans la communication inter et intra spécifique, induisent des mécanismes de défense ou encore influencent des processus physiologiques (Effmert et al., 2012). À titre d'exemple, des études ont montré que les COVs émis par les rhizobactéries favorisent la croissance de plantes ou activent leurs défenses en cas d'attaque (Gutiérrez-Luna et al., 2010; Bailly et al., 2012; Liu et al., 2015).

Comme pour les plantes, l'émission des COVs microbiens varie en fonction de l'espèce, du milieu de culture et des conditions environnementales. Ezra et al. (2003) ont montré que la richesse en saccharose du milieu de culture influence le type de COVs émis par *Muscodor albus*. Quant à Asari et al. (2016), ils ont montré des différences dans la structure de taille et de pigmentation de bactéries sur différents milieux de culture.

Depuis plusieurs années, un grand nombre de recherches s'intéresse au potentiel des mVOCs comme agents de biocontrôle dans la protection des plantes (Bailly et al., 2012; Bitas et al., 2013; Kanchiswamy et al., 2015b; Schalchli et al., 2016). Les mVOCs sont étudiés dans la lutte contre des microbes et des champignons. À titre d'exemple, la plupart des *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* ont montré une inhibition significative de la croissance de champignons pathogènes (Kai et al., 2009; Méndez-Vilas, 2013).

Une base de données créée en 2014 recense près de 1000 composés volatils d'origine bactérienne ou fongique (Lemfack et al., 2014).

Les champignons émettent aussi des COVs dont les fonctions s'apparentent à celles des bactéries. Un chapitre consacré aux émissions de COVs des champignons sera détaillé plus loin.

1.2. Les composés organiques volatils émis par les champignons

1.2.1. Introduction

Depuis quelques décennies, les avancées au niveau des techniques d'analyse ont permis d'identifier de manière plus précise les COVs émis par les champignons. Selon la littérature, plus de 300 COVs fongiques ont déjà pu être identifiés (Hung et al., 2015) et sont répertoriés dans la base de données mVOC (Lemfack et al., 2014). Les composés les plus souvent identifiés font partie des hydrocarbures, des aldéhydes, des cétones, des alcools, des phénols, des thioalcools, des thioesters et leurs dérivés (Chiron et al., 2005; Korpi et al., 2009; Ortíz-Castro et al., 2009; Lemfack et al., 2014). Les COVs émis sont en réalité un cocktail complexe de composés qui peut varier selon l'espèce de champignon, la température, le substrat et d'autres variables environnementales (Hung et al., 2015). Comme dit précédemment, la propriété de diffusion dans l'atmosphère et dans le sol permet aux COVs d'avoir un rôle important dans la communication chimique.

Dans les études publiées, l'intérêt des COVs fongiques est plus souvent économique qu'écologique (Bennet et al., 2013; Bitas et al., 2013; Hung et al., 2015). En effet, les champignons et leurs odeurs sont présents dans de nombreuses applications. Les macro-champignons sont connus pour leurs propriétés gustatives et ont une grande valeur dans l'art culinaire. Les dégâts des eaux dans les bâtiments sont eux repérés grâce aux odeurs spécifiques des champignons et ils peuvent avoir un impact négatif sur la santé humaine entraînant le syndrome du bâtiment malsain (Morath et al., 2012; Hung et al., 2015).

Depuis plusieurs années, de plus en plus d'études se penchent sur les applications des COVs fongiques dans les rôles écologiques. Pour citer quelques exemples, les COVs fongiques en agriculture peuvent être utilisés dans des stratégies de lutte biologique pour la prévention de la croissance de pathogènes sur les cultures. Dans l'industrie alimentaire, ils sont utilisés dans la

fumigation luttant contre la pourriture après récolte. Un dernier exemple est l'utilisation des COVs fongiques comme source de carburant, appelé mycodiesel. (Morath et al., 2012)

1.2.2. Intérêt et rôles des COVs émis par les champignons

L'intérêt pour les COVs fongiques est grandissant et, au vu de leur potentiel, touche de nombreux domaines scientifiques comme l'entomologie, la phytopathologie, la mycologie ou encore la médecine (Hung et al., 2015).

a) Mauvaise odeur comme indicateur de moisissure

Les mauvaises odeurs des aliments ou des stocks alimentaires sont souvent dues à des COVs émis par des métabolismes microbiens. Elles peuvent être un indicateur direct d'une contamination (Schnürer et al., 1999) comme par exemple, dans les industries de jambon, de boulangerie ou encore dans les récoltes agricoles (Jeleń et al., 1998; Keshri et al., 2002; Nieminen et al., 2008).

Ces mauvaises odeurs permettent aussi de détecter les moisissures dans les bâtiments, souvent signe d'un dégât des eaux (Matysik et al., 2008).

Dans le domaine du compostage, Müller et al. (2004) ont montré que le profil des COVs fongiques émis dépendait du type d'échantillonnage et du type de processus d'ingénieries utilisés. Ces observations ont permis d'adapter les technologies afin de réduire les mauvaises odeurs.

b) COVs comme empreinte spécifique

Certains COVs, appelés marqueurs, peuvent être caractéristiques d'un genre/d'une espèce de champignon. La caractérisation des COVs de plusieurs Basidiomycètes a montré qu'il était possible de distinguer les membres du genre *Penicillium* au niveau de l'espèce (Larsen et al., 1995). Polizzi et al., (2009) ont, eux, permis de distinguer *Chaetomium spp.* et *Epicoccu spp.* dans un groupe de 76 souches de genres différents. Ces marqueurs pourraient faciliter la recherche et l'identification de champignons indésirables.

c) Biofiltre et biodiesel

Les champignons ne sont pas seulement des producteurs de COVs, ils peuvent aussi les métaboliser. En effet, certains champignons ont la propriété de dégrader d'autres composés volatiles considérés comme des polluants. Par exemple, Kennes et al. (2004) ont montré l'efficacité de l'incorporation de champignons sur des biofiltres pour la dégradation de polluants présents dans les gaz d'échappement des voitures.

Strobel et al. (2011), quant à eux, ont montré que les COVs fongiques peuvent être utilisés comme sources d'énergie biologique par transformation directe des déchets végétaux en diesel.

d) Détection de maladies

Les odeurs des composés volatiles permettent la détection de maladies et sont utilisées par les phytopathologistes et les mycologistes médicaux (Casalnuovo et al., 2006). Par exemple, Darriet et al., (2002) ont identifié plusieurs composés spécifiques de raisins malades comme le 1-octen-3-one et le (Z)-1,5-octadien-3-one dans le cas de mildiou engendré par *Uncinula necator* et causant de graves infections sur les vignes.

Un autre exemple concerne *Aspergillus fumigatus* qui est connu pour provoquer une infection pulmonaire chez l'homme. Bazemore et al. (2012) et Heddergott et al. (2014) ont déterminé par des expériences *in vitro* que l'infection par *A. fumigatus* pourrait être détectée par la présence du farnasène et de terpènes. De même, lors de tests sur des patients infectés, le composé 2-pentylfuran a été retrouvé dans leur respiration et suggère que ce composé est lié à l'infection (Chambers et al., 2009).

e) Utilisation dans la lutte biologique

Les champignons produisent également des COVs qui ont des effets sur les plantes, les insectes et les microorganismes (Lee et al., 2009; Ezquer et al., 2010; Davis et al., 2013) . Dans le contexte actuel où l'emploi des pesticides chimiques est de plus en plus controversé, le potentiel de certains COVs fongiques comme agent de biocontrôle se présente comme une alternative prometteuse (Morath et al., 2012).

Effets sur les plantes

Des études ont montré que les COVs fongiques participent au développement des plantes. Ainsi, les COVs peuvent augmenter la croissance des plantes comme les bouquets émis par *Trichoderma viride* et *Cladosporium cladosporioides* sur la croissance respective d'*Arabidopsis* et de plants de tabac (Hung et al., 2013; Paul et al., 2013) ou favoriser l'accumulation d'amidon dans les feuilles de plusieurs espèces comme le montrent Ezquer et al., (2010).

Les COVs fongiques peuvent également intervenir dans des réactions de plantes soumises stress biotique ou abiotique. A titre d'exemple de réaction à un stress abiotique, les COVs produits par le *Phoma* sp. contribuent à la capacité de survie de *Larrea tridentata*, plante endophyte, dans des conditions d'habitat désertique (Strobel et al., 2011). Certains volatils

fongiques, quant à eux, induisent des résistances systémiques chez les plantes (Naznin et al., 2014).

Toutefois, tous les COVs fongiques n'ont pas un effet positif sur les plantes. La plupart des COVs de la célèbre truffe inhibent la croissance des plantes (Splivallo et al., 2007; Tarkka et al., 2007) comme sur *Arabidopsis thaliana* où les COVs nuisent à la germination des graines, à la croissance des racines primaires et des feuilles (Splivallo et al., 2009). Les COVs de *Fusarium culmorum* et *Cochliobolus sativus* induisent un changement de morphologie des racines de l'orge (Fiers et al., 2013).

Effet sur les insectes

Les entomologistes ont découvert que les espèces fongiques, elles aussi, émettent des phéromones, allomones, kairomones etc. (Rohlf et al., 2005; Mburu et al., 2011). De nombreux COVs fongiques ont pour effet d'attirer ou d'éloigner des insectes ; ils peuvent servir de phéromones d'agrégation ou de stimulant dans la ponte des œufs (Hung et al., 2015) et aussi intervenir dans la détection des hôtes ou l'attraction des proies (Davis et al., 2013). La reconnaissance des COVs dans les interactions entre microorganismes et insectes peut mener à la recherche d'une utilisation de ces COVs en lutte biologique.

Takken (1991) a étudié les odeurs qui attirent les moustiques vecteurs de la malaria et de la fièvre jaune. Le 1-octen-3-ol, alcool de champignon, a été identifié comme responsable et peut être utilisé comme leurre dans les pièges pour les espèces importantes en médecine humaine et vétérinaire (French et al., 1989; Kline et al., 1991). Le 1-octen-3-ol sert aussi de substance attractive pour les moucherons (Blackwell et al., 1996). Dans la même optique, les COVs de l'espèce fongique entomopathogène *Beauveria bassiana* ont été étudiés pour leur potentiel en biocontrôle entomologiste (Crespo et al., 2008), et il a été démontré que les COVs de *B. bassiana* peuvent être utilisés comme biocide efficace contre les moustiques (George et al., 2013)

Un autre exemple intéressant est développé par Azeem et al., (2015) qui ont montré que les volatils fongiques produits sur la sciure de charançons du pin protègent les œufs de ces charançons en trompant les odeurs perçues par les prédateurs du charançon.

Effet sur les champignons et autres microorganismes

Plusieurs champignons produisent des COVs possédant des propriétés antifongiques et antibactériennes. Par exemple, les COVs de *Oxyporus latemarginatus* ont montré des effets négatifs inhibiteurs de croissance sur les pathogènes *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* et *Leptosphaeria sp.* (Ezra et al, 2003; Atmosukarto et al., 2005; Lee et al., 2009).

De même, le bouquet de COVs émis par *Muscodor albus* a montré des effets inhibiteurs sur la germination de spores de plusieurs genres de *Tilletia* qui infectent le riz (Goates et al., 2009). Le bouquet de *M. albus* a aussi montré un effet mortel pour un grand nombre de pathogènes comme *Pythium ultimum*, *Ustilago hordi* ou encore *Staphylococcus aureus* (Strobel, 2006). De plus, *M. albus* et d'autres espèces du même genre ont montré leur capacité de contrôler des maladies avant et après récoltes (Alpha et al., 2015; Hutchings et al., 2017). L'utilisation de COVs de *M. albus* a même été suggérée comme une solution prometteuse pour remplacer la fumigation au bromométhane dans la lutte contre des maladies des plantes transmises par le sol. Le comportement inhibiteur envers d'autres individus pourrait s'expliquer par une réaction de défense ou de concurrence.

Certains champignons sont capables d'émettre des COVs qui contrôlent leur propre développement. Le bouquet de COVs de *M. albus* a montré des effets de réduction sur sa propre croissance, et des observations similaires ont été observées chez *Colletotrichum fragariae* (Miyagawa et al., 2000). Ce phénomène fait partie d'un processus appelé « auto-inhibition ». Ce processus est utilisé par les cellules des microorganismes pour communiquer entre elles par le biais de molécules sécrétées dans le milieu lorsque la densité de population est élevée. Ce mécanisme, appelé « *quorum sensing* (QS) » a d'abord été découvert chez les bactéries mais a été récemment observé chez les champignons. (Jorge Barriuso, 2015)

Peu d'études se penchent sur le phénomène d'auto-inhibition et mènent des recherches sur la détermination des COVs responsables des effets auto-inhibiteurs observés.

Breeuwer et al. (1997) ont observé qu'à de fortes concentrations de spores, la germination de *Rhizopus oligosporus* est faible. L'analyse des filtrats de culture a montré la présence d'acide nonanoïque, 5-isobutyroxy- β -ionone, acide vanillique et des esters cinnamiques, 3,4-diméthoxy-cinnamique et ester méthylique qui pourraient être les composés participants à la baisse de germination. Dans la même optique, Aver'Yanov et al. (2011) ont montré que la germination des spores de *Cladosporium cucumerinum* dépendait de la densité de spores.

Le composé 1-octen-3-ol, connu comme l'alcool de champignon, a été identifié comme composé induisant l'auto-inhibition de la germination des spores de *Penicillium paneum*, *Aspergillus nidulans* et *Lecanicilium fungicola* (Chitarra et al., 2004; Herrero-Garcia et al., 2011; Berendsen et al., 2013). Chitarra et al. (2004) précisent qu'une densité importante de spores (10^9 spores/mL) engendrait un taux de germination faible chez *P. paneum*. Albuquerque et al. (2012), quant à eux, ont montré que les deux alcools aromatiques phényléthanol et tryptophol régulent la morphogenèse de *Saccharomyces cerevisiae* durant des conditions de famine d'azote. Ce dernier exemple montre que le QS se produit généralement lorsque des conditions de stress surviennent.

Bien que les recherches sur l'auto-inhibition soient encore à leur début, la découverte de ce phénomène pourrait permettre le développement de nouvelles technologies dans la prévention d'infections fongiques.

La littérature éveille donc la curiosité et ouvre comme perspective l'utilisation des COVs fongiques comme agents de biocontrôle pour améliorer la croissance des plantes, leur productivité ou leur résistance à des maladies. Ils peuvent être vus comme une alternative aux pesticides conventionnels pouvant contribuer durablement à la protection et à la production des cultures.

2. Objectif de la recherche

Le sujet de la recherche s'articule autour de deux espèces de champignons : *Fusarium culmorum* et *Cochliobolus sativus*. Comme présenté dans l'introduction, ces deux Ascomycètes sont les principaux agents de la pourriture racinaire ainsi que de la fonte des semis des céréales et les pertes de rendement chez l'orge peuvent atteindre 33% (Karov et al., 2009). L'infection de ces deux pathogènes se retrouve aussi bien au niveau des semences que des racines des plantes et se remarque par la présence de lésions brunes pouvant s'étendre en lésions nécrotiques entraînant un ralentissement du développement voire la mort du semis (Fiers et al., 2013).

Dans un contexte de réduction des fongicides chimiques, des méthodes alternatives de lutte contre ces pathogènes doivent être développées. C'est pourquoi le sujet de cette étude vise l'identification des composés organiques volatils émis par *F. culmorum* et *C. sativus* en situations de stress et l'étude de leur potentiel en lutte biologique.

Les objectifs s'organisent en trois parties :

- Identifier des composés organiques volatils émis par *Fusarium culmorum* et *Cochliobolus sativus* dans deux situations de stress, à savoir la culture des souches en milieu pauvre et la culture en surpopulation,
- Tester le bouquet de COVs de chaque traitement sur la croissance des souches elles-mêmes,
- Tester des COVs individuellement sur la croissance des souches. Les COVs testés sont choisis dans le(s) bouquet(s) qui a(ont) eu un effet significatif sur la croissance des pathogènes.

3. Matériel et méthode

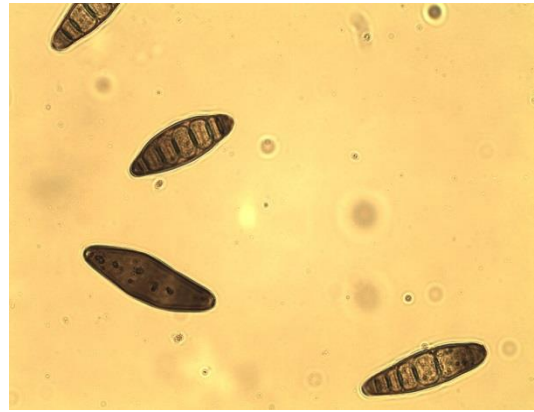
3.1. Matériel biologique

Les souches fongiques utilisées sont *Fusarium culmorum* (MUCL 28166) et *Cochliobolus sativus* (MUCL 46854). Elles sont fournies par la Collection belge de Microorganismes (BCCM-MUCL) de Louvain-la-Neuve. Elles sont cultivées sur un milieu PDA (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne, 39 g/L) à 23°C sous une photopériode de 16:8 (L:D).

Les spores de *F. culmorum* et *C. sativus* sont illustrés à la figure 3. Les spores de *F. culmorum* sont fusiformes et cloisonnées. Ce champignon ne forme que des macro-conidies de taille variable : 30 – 50µm de longueur, 5.0 – 7.5 µm de largeur (Scherm et al., 2013). Les spores de *C. sativus* sont de formes elliptiques, cloisonnées, et leur taille est aussi très variable : 60 à 120µm de longueur et 12 à 20µm de largeur (Kumar et al., 2002)



A



B

Figure 3 – Spores de *F. culmorum* (A) et *C. sativus* (B) observées au microscope optique. Echelle : 40µm.

3.2. Traitements appliqués

L'identification des COVs fongiques ainsi que leurs effets sont étudiés pour les deux souches de champignons cultivées dans des conditions de stress différentes.

Les conditions de culture appliquées sont les suivantes :

- 1) Culture dans des conditions de croissance normales, sur PDA, à une concentration de spores de 2.10^3 spores/mL.
- 2) Culture dans des conditions de croissance sur un milieu pauvre, sur de l'eau gélosée (10 g d'agar/L), à une concentration de 2.10^3 spores/mL.
- 3) Culture dans des conditions de surpopulation, sur un milieu PDA à une concentration de 10^7 spores/mL pour *F. culmorum* et de 10^6 spores/mL pour *C. sativus*.

3.3 Identification des composés organiques volatils

L'ensemble du protocole de cette étape d'identification des composés organiques volatils émis par *F. culmorum* et *C. sativus* dans les 3 traitements s'inspire de celui de l'étude de Fiers et al., (2013).

3.3.1 Culture des champignons et préparation des échantillons

Culture

F. culmorum et *C. sativus* sont cultivés sur un milieu PDA dans des boîtes de Pétri de 86 mm de diamètre et mis en chambre de culture à $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sous une photopériode de 16:8 pendant 14 jours. Une mise en collection est également réalisée par cryoconservation à -80°C dans du glycérol à 30%.

Concentration de spores

Les concentrations de spores voulues, c'est-à-dire 2.10^3 , 10^6 ou 10^7 spores/mL, sont obtenues en plaçant quelques mL de milieu PDB (Pronadisa, Madrid, Espagne, 24 g/L) dans une boîte de Pétri colonisée par *F. culmorum* ou *C. sativus*. Le mycélium est ensuite légèrement gratté avec un scalpel stérilisé pour récolter le milieu PDB et les spores. Ce mélange est filtré à travers une double couche d'étamine placée sur un entonnoir stérilisé.

La concentration de la suspension est obtenue par la formule de la cellule de Fuchs-Rosenthal (Hecht Assistant, Sondheim/Rhön, Allemagne). La méthode de Fuchs-Rosenthal consiste à compter, à l'aide d'un microscope, le nombre de spores se retrouvant dans 16 carrés. Ensuite, la concentration de la suspension est obtenue par la formule suivante :

$$[suspension]_{spores/mL} = \text{moyenne des spores sur 16 cellules} \cdot 80\,000$$

La concentration voulue est ensuite obtenue en calculant le volume de suspension à mélanger avec le PDB. Ce volume est calculé par la formule :

$$V_{suspension} = \frac{C_{voulue} \cdot V_{voulu}}{C_{suspension}}$$

Échantillons

La culture fongique pour l'identification des COVs se réalise sur 7 mL de PDA ou eau gélosée gélifiée en pente dans des vials de micro-extraction sur phase solide (SPME) de 20 mL (Filter Service, Eupen, Belgique) qui sont fermés avec des bouchons hermétiques possédant un septum (White silicone/blue PTFE, Filter Service).

Au préalable, les vials SPME sont lavés selon le protocole suivant : ils sont placés pendant 15 minutes dans 1 litre d'eau distillée contenant 10 mL de RBS T 150 (Chemical Products R. Borghgraef S.A, Belgique). Ensuite, ils sont rincés trois fois à l'eau distillée puis une fois à l'éthanol. Enfin, ils sont placés à l'étuve à 120°C pendant une heure. Ces étapes permettent de minimiser les odeurs présentes dans les vials. Une fois séchés, les vials SPME sont remplis avec 7 ml de milieu puis fermés avec de l'ouate recouverte d'aluminium et sont passés à l'autoclave pour être stérilisés. Ils sont ensuite mis à refroidir en position inclinée de manière à obtenir une pente dans le milieu de culture

Le volume de suspension de spores placé à l'intérieur des vials est de 50µL pour chaque traitement de manière à ce que la suspension recouvre l'entièreté de la surface du milieu PDA. Les vials sont ensuite placés dans une chambre de culture à 23°C +/-2°C sous une photopériode de 16:8. Deux durées de culture ont été testées par traitement : 7 et 14 jours. Pour les deux premiers traitements (culture sur milieu pauvre et conditions normales) réalisés sur *F. culmorum* et pour les deux durées de culture, 3 répétitions sont réalisées. Pour les autres traitements (culture en conditions de surpopulation et *C. sativus* cultivés sur milieu pauvre et

en conditions normales) et pour chaque durée de culture, 4 répétitions sont réalisées. Un vial vide et un vial contenant uniquement le milieu (PDA ou eau gélosée selon le traitement) sont prévus dans chaque cas et ils sont fermés hermétiquement en même temps que les répétitions du traitement pour servir de contrôles (figure 4). Lors des analyses, un blanc colonne de la machine de détection (GC-MS) est également réalisé et un blanc de chaque fibre SPME seront également réalisés.



Figure 4 - Représentation des échantillons pour *F. culmorum* sous conditions de surpopulation à 7 jours de croissance

3.3.2. Méthode d'identification des composés organiques volatils

Micro-extraction sur phase solide (SPME)

Les fibres SPME utilisées dans notre étude sont des fibres triples, recouvertes de trois épaisseurs de 65µm de phase stationnaire : le divinylbenzene, le carboxène et le polydiméthylsiloxane (DVB – Carboxen – PDMS) (Supelco, Bellefonte, Pa, États Unis).

Pour être utilisées, les fibres sont placées sur un support à piston.

Avant de commencer l'extraction, les fibres sont conditionnées à 270°C pendant 1 heure, suivant les recommandations d'utilisation.

Chaque vial est placé avant le prélèvement dans un bain marie de 25°C pendant 10 minutes afin de concentrer les COVs dans l'espace de tête et d'obtenir des conditions optimales d'extraction.

Une fois une fibre conditionnée, elle est placée à l'intérieur du vial en transperçant le septum du bouchon. Grâce au support à piston, la fibre est libérée et exposée aux COVs accumulés dans l'espace de tête du vial pendant 20 minutes à la même température (Figure 5).

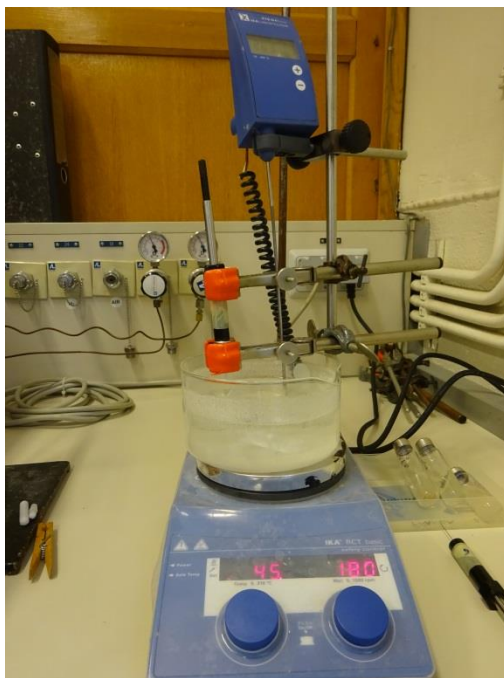


Figure 5 - Représentation de l'étape de prélèvement par micro-extraction sur phase solide.

Chromatographie sur phase gazeuse couplé à une spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses sont réalisées sur un chromatographe en phase gazeuse (Agilent Technologies 7890A) couplé à un détecteur sélectif de masse (Agilent Technologies 5975C) avec le logiciel Agilent Chemstation version E.02.00.493.

Après chaque prélèvement, la fibre SPME est placée dans l'injecteur du GC où les composés sont désorbés via un mode splitless pulsé dans un HS-liner de 1.5 mm (pression d'injection pulsée de 30 psi pendant 1 minute) pendant 5 minutes à 250°C (Figure 6).

La séparation des COVs est réalisée sur une colonne polaire VF-WAX (Agilent Technologies, États-Unis ; 30 m x 0.250 mm I.D, film de 0.25µm d'épaisseur). Les composés sont élués vers la colonne par l'hélium, gaz vecteur, à flux constant de débit 1.5 mL/min, et la température d'entrée est de 250°C.

Ensuite, le programme des températures est appliqué : 35°C pendant 2 minutes, 5°C/min jusqu'à 155°C, 20°C/min jusqu'à 250°C et pour finir, 250°C pendant 10 minutes.

Le spectromètre de masse est exploité en mode impact électronique (EI) à 70 eV, à une température source de 230°C, de type quadripôle de température 150°C, scannant des masses variant de 20 à 350 amu, un seuil de 150 amu et une vitesse de 4.27 scans/s.



Figure 6 - Machine de chromatographie sur phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse. La flèche rouge désigne le lieu de l'insertion de la fibre SPME.

Identification des COVs

Les données brutes de la GC-MS sont obtenues sous forme de chromatogramme. L'identification des COVs se réalise ensuite en comparant les temps de rétention et les masses spectrales avec les bases de données Wiley 275, pal600k et NBS75K. Les résultats ainsi obtenus se retrouvent sous forme de fichier .txt où, pour chaque détection, trois noms de molécules sont proposés avec les détails du temps de rétention, de l'aire sous la courbe, du CAS, de la référence et d'un coefficient de certitude.

3.3.3. Analyse et traitement des résultats

Le traitement des données est effectué sous Matlab®. Un code spécifique est établi afin de garder uniquement le premier nom des 3 composés proposés par détection et de conserver une seule copie des composés. Ensuite, un code est réalisé pour obtenir une comparaison des composés communs aux échantillons deux par deux et entre toutes les répétitions. Les résultats triés sortent dans un fichier Excel. Enfin, une synthèse sur Excel est obtenue en gardant les composés ayant une qualité supérieure à 80%, présents dans au moins deux échantillons et qui ne se retrouvent pas dans les différents contrôles. Ces résultats seront exploités pour choisir les composés individuels à tester. (ANNEXE I)

3.3.4. Indices de KOVATS

Le mélange d'une série homologue d'hydrocarbures (C7-C30) utilisés pour calculer les indices de Kovats provient de l'entreprise Supelco® (Bellefont, USA) et présente une concentration de 1000 µg de n-alcane/mL dans l'hexane. Ce mélange est dilué dix fois avant d'être injecté dans la machine GC-MS. Les temps de rétention de ces hydrocarbures vont permettre de calculer l'indice de Kovats des composés identifiés de notre étude.

La formule utilisée (Kováts, 1958) pour calculer l'indice de rétention Kovats est :

$$I_x = 100 * (n + \frac{RT_x - RT_n}{RT_N - RT_n})$$

I_x = indice de Kovats pour le composé x

RT = temps de rétention du composé x

RT = temps de rétention du n-alcane élué avant le composé x

RT = temps de rétention du n-alcane élué après le composé x

n = nombre de carbones du n-alcane élué avant le composé x

3.4. Effet des bouquets de COVs sur la croissance des champignons

Cette section explique le déroulement de l'étude de l'effet des bouquets de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* sur leur propre croissance.

3.4.1. Dispositif expérimental

Pour étudier les effets du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* en situation de stress, c'est-à-dire une croissance sur un milieu pauvre ou en surpopulation, un dispositif expérimental est élaboré comme représenté à la figure 7.



Figure 7 - Dispositif expérimental pour l'étude des effets des bouquets de COVs émis par *F. culmorum* ou *C. sativus* en situation de stress sur la croissance des champignons eux-mêmes.

Le dispositif est construit à l'aide de deux flasques de culture cellulaire (Greiner Bio-One, Belgique) mises bout à bout et fermées hermétiquement avec du parafilm et du scotch. De cette manière, aucun contact direct n'a lieu entre les deux flasques, mais les molécules volatiles peuvent circuler librement.

Un volume de milieu (PDA ou eau gélosée) de 50 mL, mesuré à l'aide d'un tube Falcon stérile de 50 mL, est placé dans chaque flasque.

Dans une des flasques, le champignon est cultivé en situation de stress (milieu pauvre ou conditions de surpopulation) et dans l'autre, le champignon est placé en conditions normales de croissance (Figure 8).

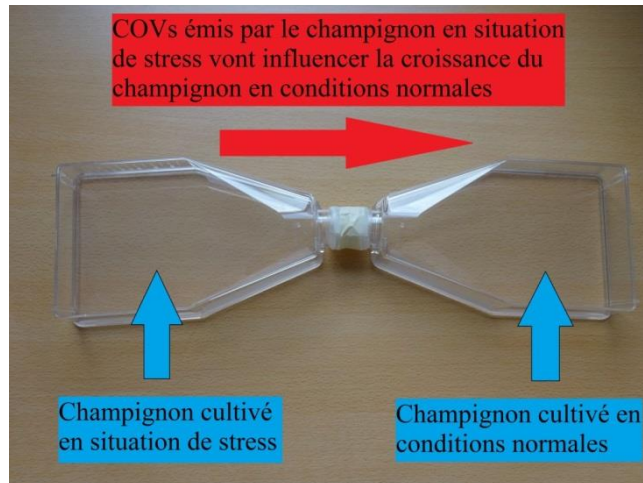


Figure 8 - Représentation schématique de la croissance du champignon en conditions normales sous l'effet des COVs émis par le champignon en situation de stress.

Pour la croissance fongique en conditions normales et sur milieu pauvre, le champignon est inoculé sous forme d'un disque de mycélium de 5 mm de diamètre afin que la croissance se déroule de manière circulaire (Figure 9).



Figure 9 - Disque de mycélium de 5 mm de diamètre pris dans une boîte de culture de *C. sativus*.

Pour la croissance fongique en conditions de surpopulation, la concentration de spores voulue a été calculée comme expliqué au point 3.3.1. et le volume de la suspension de spores placé dans la flasque est de 0.5 mL. Ce volume permet de recouvrir totalement la surface du milieu. L'étalement de la suspension est réalisé au moyen de deux râteliers accrochés bout à bout pour atteindre le fond des flasques (Figure 10).



Figure 10 - Dispositif permettant l'étalement de la suspension de spores sur l'ensemble de la surface du milieu contenu dans les flasques réalisé à l'aide de deux râtaux mis bout à bout.

Pour cette expérience, 8 répétitions ainsi que 8 témoins (pour lesquels une flasque contient le champignon en conditions de croissance normales et l'autre contenant uniquement du milieu) sont réalisés par traitement. Les flasques sont ensuite mises dans une chambre de culture à $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sous une photopériode de 16:8. Le diamètre de croissance des champignons en conditions normales soumis aux COVs est apprécié par deux mesures perpendiculaires tous les jours jusqu'à ce que le champignon remplisse entièrement la flasque ou jusqu'à un maximum de 14 jours.

3.5. Effets individuels des COVs sur la croissance des champignons

L'étude des effets individuels des COVs sur la croissance de *F. culmorum* et *C. sativus* se réalisera uniquement pour les bouquets où un effet significatif sur la croissance est observé à l'étape précédente.

Le choix des COVs se portera sur les composés ayant une qualité supérieure à 80%, présents dans un plus grand nombre d'échantillons, faisant partie des principaux pics sur le chromatogramme et de la disponibilité du composé au laboratoire.

3.5.1. Dispositif expérimental

Pour tester les COVs individuellement, le dispositif expérimental utilisé est représenté à la figure 11 ci-dessous.



Figure 11 - Dispositif expérimental utilisé pour tester les COVs individuellement sur la croissance de *F. culmorum* et *C. sativus*.

Dans ce dispositif, une boîte de Pétri carrée (Greiner, Belgique, 12 cm) contient le couvercle d'une boîte de Pétri ronde de 36.5 mm de diamètre dans l'un de ses coins. Un volume de 50 mL de milieu PDA, mesuré à l'aide d'un Falcon de 50mL, est placé à l'intérieur de la boîte de Pétri carrée. Ensuite, dans cette dernière, le champignon est inoculé sous forme d'un disque de mycélium de 5 mm de diamètre afin que la croissance se fasse de manière circulaire.

Dans la boîte de Pétri circulaire, le composé organique volatil est placé sur un morceau de filtre. Les deux parties de ce dispositif sont donc en contact uniquement par voie aérienne.

Dans cette étude, 3 concentrations sont testées pour chaque molécule: 100 – 500 – 1000 μM . Pour chaque concentration, 4 répétitions sont réalisées ainsi que 4 témoins (absence de composé volatil). Au total, 16 boîtes de Pétri carrées sont établies pour chaque composé testé. Seul le cas du sativène est différent : les concentrations testées pour ce composé sont de 500 et 1000 μM , et seules 3 répétitions ont été réalisées par concentration et pour les témoins.

Les composés testés se retrouvent sous forme liquide. Le volume placé sur le filtre est calculé à l'aide de la masse molaire de la molécule et de sa densité moléculaire par la formule suivante :

$$V_{recherché} = \frac{[composé]_{voulue} \cdot MM \cdot V_{air\ Pétri}}{densité\ moléculaire\ de\ la\ molécule}$$

Selon les dimensions de la boîte de Pétri carrée, le volume de l'air dans la boîte contenant le milieu et après fermeture du couvercle est de 0.1 litre.

Une fois le composé placé sur le filtre, la boîte de Pétri carrée est fermée hermétiquement au moyen d'une double couche de parafilm et de papier film. Les boîtes sont ensuite mises dans une chambre de culture à 23°C +/- 2°C sous une photopériode de 16:8, et le diamètre de croissance des champignons est mesuré tous les jours jusqu'à ce que le champignon remplisse complètement la boîte de Pétri carrée ou jusqu'à un maximum de 14 jours. La méthode de prises de mesures est identique à celle décrite en 3.4.1.

3.6. Analyse statistique

Les résultats des mesures des diamètres de croissance des champignons obtenus à l'étape 3.4 et 3.5 sont traités statistiquement avec le logiciel Minitab17®. Une Anova one-way est réalisée pour chaque jour de prise de mesure en utilisant la structuration de moyenne de Dunnett. Cette méthode de Dunnett permet une comparaison des effets de plusieurs modalités d'un traitement avec un niveau de référence. Dans cette étude, les références seront des témoins réalisés pour chaque traitement et chaque analyse.

3.7. Injection de standard

Des standards ont été réalisés afin de valider l'identification de certains COVs trouvés de la section 3.3.

Huit standards seront testés. Le choix se porte sur les COVs préalablement choisis pour les tests individuels de la section 3.5.

Une vérification des temps de rétention a incité à réaliser deux lots de standard de manière à ce qu'aucun composé ne se superpose sur les chromatogrammes.

Les composés sont mélangés à un solvant, l'éthanol, à une proportion de 10 µL de composé dans 10 mL d'éthanol. Ensuite, 1 mL du mélange a été placé dans des vials de même type qu'à l'étape 3.3.1. Pour chaque lot, trois répétitions sont réalisées.

L'analyse des composés suit le protocole décrit à la section 3.3.2.

4. Résultats et discussion

4.1. Identification des COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus*

4.1.1. Identification des composés organiques volatils émis par traitement

COVs émis par F. culmorum cultivé sur milieu pauvre

Tableau 1 - Liste des COVs émis par *F. culmorum* cultivé en milieu pauvre à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>F. culmorum</i> sur milieu pauvre à 7 jours de croissance ^c			COVs émis par <i>F. culmorum</i> sur milieu pauvre à 14 jours de croissance ^d		
			1	2	3	1	2	3
SCHEMBL7199818	8-(disulfanyl)naphthalen-1-amine	035373-06-9				x	x	
hexamethylcyclotrisiloxane	2,2,4,4,6,6-hexamethyl-1,3,5,2,4,6-trioxatrisilane	000541-05-9	x	x				

a Liste des composés identifiés dans une colonne capillaire polaire VF-WAX.

b Nom IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) des composés.

d COVs émis par *F. culmorum* cultivé en milieu pauvre à 7 jours de croissance par échantillon N=3.

d COVs émis par *F. culmorum* cultivé en un milieu pauvre à 14 jours de croissance par échantillon N= 3.

1-3 échantillons.

Les composés identifiés émis par *F. culmorum* cultivé sur un milieu pauvre sont l'hexaméthylcyclotrisiloxane à 7 jours de croissance et le SCHEMBL7199818 à 14 jours de croissance (Tableau 1). Ces composés sont retrouvés dans deux des trois échantillons analysés.

COVs émis par F. culmorum en conditions normales

Le tableau 2 reprend les différents COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions normales de croissance. Les composés identifiés sont au nombre de 11 à 7 jours et de 5 à 14 jours de croissance.

À 7 jours de croissance, les composés isobutanol, p-xylène, alcool isoamylique, mésitylène, α -chamigrène, épi-bicyclosesquiphellandrène et le 2-phényléthanol sont émis par tous les échantillons. Aucun composé n'est émis pour les trois échantillons à 14 jours de croissance. Les composés communs aux analyses à 7 et 14 jours de croissance sont le toluène, l'isobutanol, le β -phellandrène, le mésitylène et l'épi-bicyclosesquiphellandrène.

Selon les chromatogrammes, les principaux pics sont l'acétate d'isoamyle, l'alcool isoamylique, le mésitylène et l'épi-bicyclosesquiphellandrène à 7 jours de croissance (Figure 12.A) et le toluène, l'isobutanol, l'alcool isoamylique, le mésitylène et l'épi-bicyclosesquiphellandrène à 14 jours de croissance (Figure 12.B).

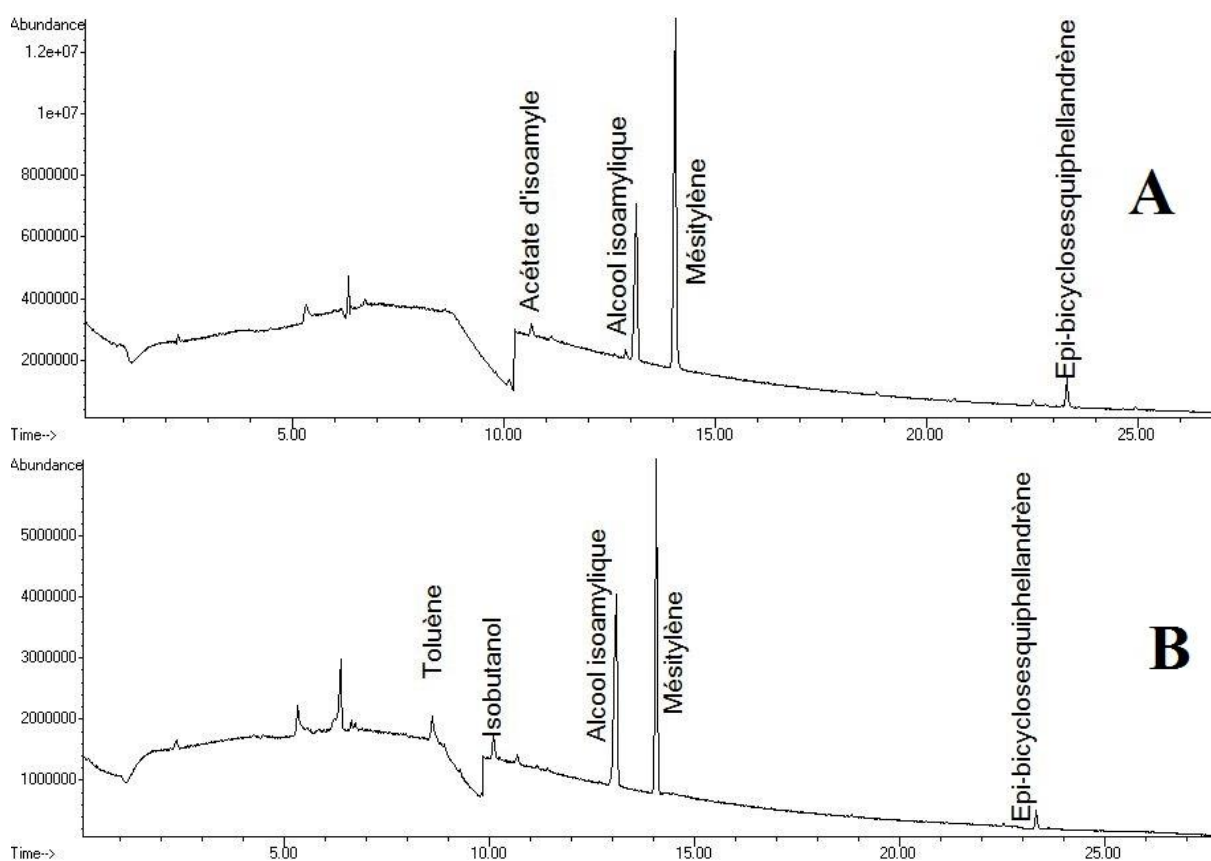


Figure 12- Chromatogrammes des COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions normales à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.

Tableau 2 - Liste des COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions normales à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions normales à 7 jours de croissance ^d			COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions normales à 14 jours de croissance ^e		
			1	2	3	1	2	3
Toluène	Toluene	000108-88-3	x		x		x	x
Isobutanol	2-methylpropan-1-ol	000078-83-1	x	x	x		x	x
Acétate d'isoamyle	3-methylbutyl acetate	000123-92-2	x		x			
p-xylène	1,4-xylene	000106-42-3	x	x	x			
β-phellandrène	3-methylidene-6-propan-2-ylcyclohexene	000555-10-2		x	x		x	x
Alcool isoamylique	3-methylbutan-1-ol	000123-51-3	x	x	x			
Mesitylène	1,3,5-trimethylbenzene	000108-67-8	x	x	x		x	x
2,6-diméthylanisole	2-methoxy-1,3-dimethylbenzene	001004-66-6		x	x			
α-chamigrène	(6R)-1,5,5,9-tetramethylspiro[5.5]undeca-1,9-diene	019912-83-5	x	x	x			
Epi-Bicyclosesquiphellandrène	(1R,4S)-4-methyl-7-methylidene-1-propan-2-yl-2,3,4,4a,5,6-hexahydro-1H-naphthalene	054324-03-7	x	x	x		x	x
2-phényléthanol	2-phenylethanol	000060-12-8	x	x	x			

a Liste des composés identifiés dans une colonne capillaire polaire VF-WAX.

b Nom IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) des composés.

c COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions normales à 7 jours de croissance par échantillon N=3.

d COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions normales à 14 jours de croissance par échantillon N=3.

1-3 échantillons.

COVs émis par *F. culmorum* en conditions de surpopulation à 10^7 spores/mL

Le tableau 3 reprend les COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation à une concentration de 10^7 spores/mL. Deux analyses à 7 jours de croissance sont réalisées à la suite d'une panne de la machine GC-MS.

Les composés identifiés sont au nombre de 6 pour la première analyse à 7 jours (29/03/2017), de 9 pour la deuxième analyse à 7 jours (25/04/2017) et de 8 à 14 jours de croissance.

Pour l'analyse du 29 mars, l'acétate d'éthyle, le toluène, l'isobutanol et l'acétate d'isoamyle se retrouvent au moins dans trois échantillons sur quatre. Le pentanol et l' α -acoradiène sont identifiés dans deux échantillons sur quatre.

Pour l'analyse du 25 avril, l'acétate d'éthyle, le toluène, l'isobutanol, l'acétate d'isoamyle l'alcool isoamylique, le sabinène et l'hémellitol se retrouvent dans tous les échantillons. Le 2-méthylbutyrate d'éthyle et l'isovalérate d'éthyle sont, quant à eux, identifiés dans deux échantillons sur trois.

À 7 jours de croissance, les composés communs aux deux analyses sont l'acétate d'éthyle, le toluène, l'isobutanol et l'acétate d'isoamyle. Ils se retrouvent dans au moins trois échantillons. À 14 jours de croissance, les composés acétate d'éthyle, toluène, 2-méthylbutyrate d'éthyle, isobutanol et épi-bicyclosesquiphellandrène se retrouvent dans au moins trois échantillons sur quatre. Le 2-méthylbutanol, le pseudocumène et l' α -acoradiène sont identifiés dans deux échantillons sur quatre.

Les composés communs aux deux analyses à 7 jours et 14 jours de croissance sont l'acétate d'éthyle, le toluène et l'isobutanol.

Selon les chromatogrammes, les principaux pics font référence à l'acétate d'éthyle, l'isobutanol, l'acétate d'isoamyle, l'alcool isoamylique et l'hémellitol à 7 jours de croissance (25/04/2017) (Figure 13.A) et l'acétate d'éthyle, le toluène, l'isobutanol, l'épi-bicyclosesquiphellandrène à 14 jours de croissance (Figure 13.B).

Tableau 3 - Liste des COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions de surpopulation 10 ⁷ (spores/mL) à 7 jours de croissance (29/03/2017) ^c				COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions de surpopulation 10 ⁷ (spores/mL) à 7 jours de croissance (25/04/2017) ^d			COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions de surpopulation 10 ⁷ (spores/mL) à 14 jours de croissance ^e			
			1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4
Acétate d'éthyle	Ethyl Acetate	000141-78-6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Toluène	Toluene	000108-88-3		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2-méthylbutyrate d'éthyle	Ethyl 2-methylbutanoate	007452-79-1					x	x		x		x	x
Isovalérate d'éthyle	Ethyl 3-methylbutanoate	000108-64-5					x	x					
Isobutanol	2-methylpropan-1-ol	000078-83-1	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
Acétate d'isoamyle	3-methylbutyl acetate	000123-92-2	x	x		x	x	x	x				
2-méthylbutanol	2-methylbutan-1-ol	000137-32-6									x		x
Pentanol	Pentan-1-ol	000071-41-0		x	x								
Alcool isoamylique	3-methylbutan-1-ol	000123-51-3					x	x	x				
Sabinène	4-methylidene-1-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hexane	003387-41-5					x	x	x				
Pseudocumène	1,2,4-trimethylbenzene	000095-63-6								x		x	

Tableau 3 (suite)

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions de surpopulation 10 ⁷ (spores/mL) à 7 jours de croissance (29/03/2017) ^c				COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions de surpopulation 10 ⁷ (spores/mL) à 7 jours de croissance (25/04/2017) ^d			COVs émis par <i>F. culmorum</i> en conditions de surpopulation 10 ⁷ (spores/mL) à 14 jours de croissance ^e			
			1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	4
Hémellitol	1,2,3-trimethylbenzene	000526-73-8					x	x	x				
α-acoradiène	(1R,4S,5S)-1,8-dimethyl-4-prop-1-en-2-ylspiro[4.5]dec-8-ene	024048-44-0	x			x				x	x		
Epi-bicyclosesquiphellandrène	(1R,4S)-4-methyl-7-methylidene-1-propan-2-yl-2,3,4,4a,5,6-hexahydro-1H-naphthalene	054324-03-7									x	x	x

^a Liste des composés identifiés dans une colonne capillaire polaire VF-WAX.
^b Nom IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) des composés.
^c COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours de croissance par échantillon le 23 mars 2017 N=4.
^d COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours de croissance par échantillon le 25 avril 2017 N=3.
^e COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation à 14 jours de croissance par échantillon N=4.
1-4 échantillons

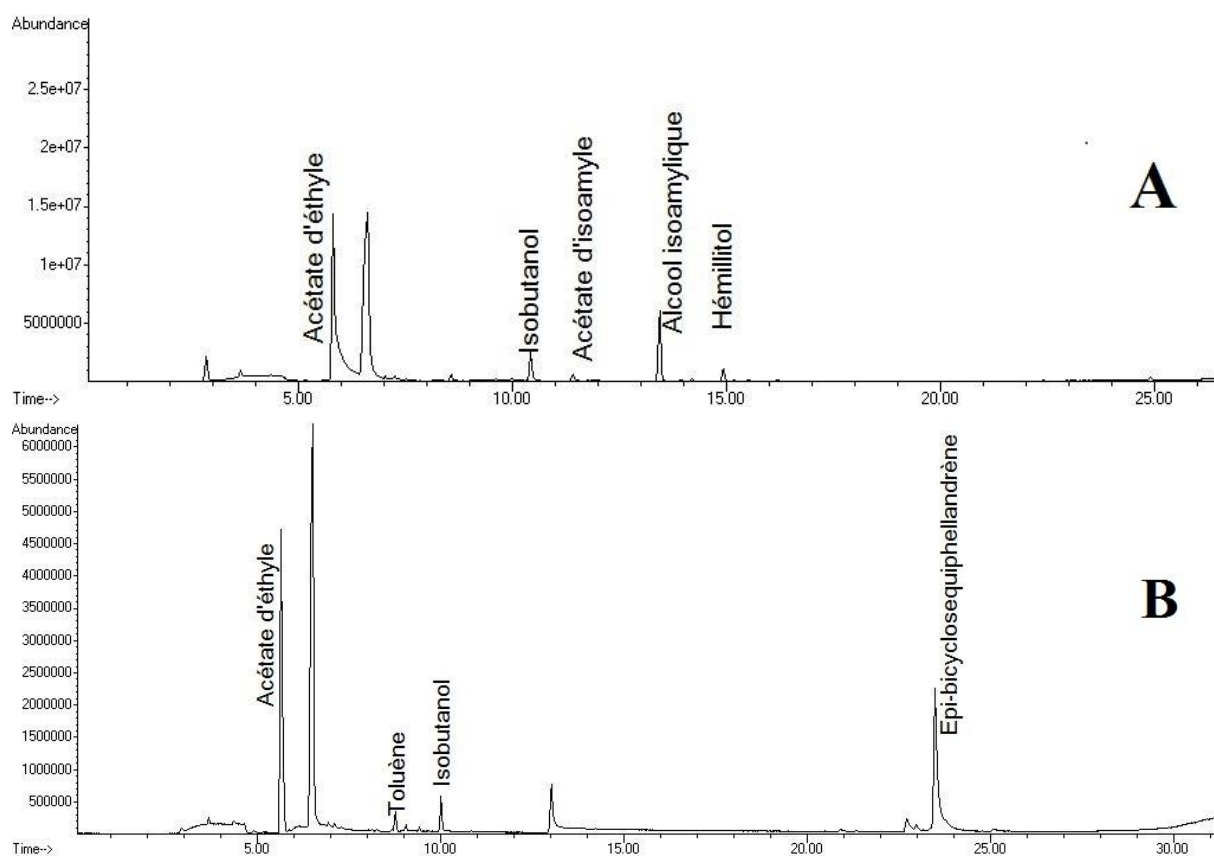


Figure 13 - Chromatogrammes des COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.

COVs émis par C. sativus en milieu pauvre

Le tableau 4 reprend les COVs émis par *C. sativus* cultivé sur un milieu pauvre. Les composés identifiés sont au nombre de 3 à 7 jours et de 4 à 14 jours de croissance.

À 7 jours de croissance, les COVs identifiés sont l'isoprène, le longifolène et le (+)-sativène. Ils se retrouvent comme les principaux pics sur le chromatogramme pour tous les échantillons (Figure 14.A).

À 14 jours de croissance, les COVs identifiés sont le 2-butanol, l'isoprène, l'isolongifolène et le (+)-sativène. Les trois derniers composés sont responsables des principaux pics sur le chromatogramme (Figure 14.B). Ces composés se retrouvent dans au moins trois échantillons sur quatre.

Les composés communs aux analyses à 7 et 14 jours de croissance sont l'isoprène et le (+)-sativène.

Tableau 4 - Liste des COVs émis par *C. sativus* cultivé en milieu pauvre à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>C. sativus</i> sur milieu pauvre à 7 jours croissance ^c				COVs émis par <i>C. sativus</i> sur milieu pauvre à 14 jours croissance ^d			
			1	2	3	4	1	2	3	4
Isoprène	2-methylbuta-1,3-diene	000078-79-5	x	x	x	x	x		x	x
2-butanol	butan-2-one	000078-93-3					x		x	
Isolongifolène	2,2,7,7-tetramethyltricyclo[6.2.1.0 ^{1,6}]undeca-3,5,9-triene	001135-66-6					x		x	x
Longifolène	4,8,8-trimethyl-9-methylidenedecahydro-1,4-methanoazulene	000475-20-7	x	x	x	x				
(+)-Sativène	(1R,3aS,4R,7R,7aR)-4-methyl-8-methylene-7-(propan-2-yl)-octahydro-1H-1,4-methanoindene	003650-28-0	x	x	x	x	x	x	x	x

a Liste des composés identifiés dans une colonne capillaire polaire VF-WAX.
b Nom IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) des composés.
c COVs émis par *C. sativus* cultivé sur un milieu pauvre à 7 jours de croissance par échantillon N=4.
d COVs émis par *C. sativus* cultivé sur un milieu pauvre à 14 jours de croissance par échantillon N=4.
1-4 échantillons

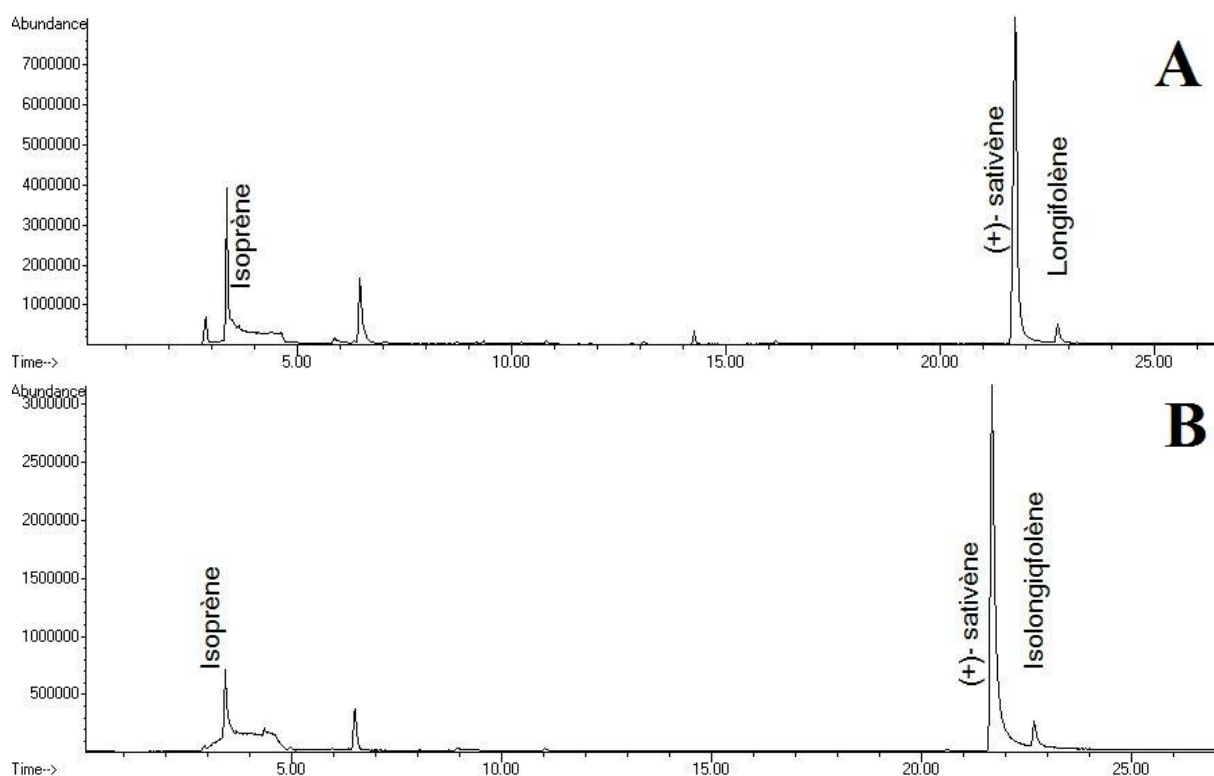


Figure 14 - Chromatogrammes des COVs émis par *C. sativus* cultivé en milieu pauvre à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.

COVs émis par *C. sativus* en conditions normales

Le tableau 6 reprend les COVs émis par *C. sativus* cultivé dans des conditions normales de croissance. Les composés identifiés sont au nombre de 12 à 7 jours et de 7 à 14 jours de croissance.

À 7 jours de croissance, l'isoprène, l'isobutanol, l'alcool isoamylique, l'(+)- δ -cadinène, l' α -ylangène, le (+)-sativène, l'(+)-aromadendrène, le longifolène et le germacrène A se retrouvent dans au moins trois échantillons sur quatre. L' α -élémane le β -patchoulène et l' α -cédrène sont identifiés dans deux échantillons sur quatre.

À 14 jours de croissance, seuls l'isobutanol et le (+)-sativène se retrouvent dans au moins trois échantillons sur quatre. Le pentane, le β -selinène, l'(+)-aromadendrène, l'isolongifolène et le longifolène sont identifiés dans deux échantillons sur quatre.

Les composés communs aux analyses à 7 et 14 jours de croissance sont l'isobutanol, le sativène, l'(+)-aromadendrène et le longifolène.

Selon les chromatogrammes, les principaux pics sont le (+)-sativène et le longifolène à 7 jours (Figure 15.A) et à 14 jours de croissance (Figure 15.B).

Tableau 5 - Liste des COVs émis par *C. sativus* en conditions normales à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions normales à 7 jours croissance ^c				COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions normales à 14 jours croissance ^d			
			1	2	3	4	1	2	3	4
Pentane	Pentane	000109-66-0						x		x
Isoprène	2-methylbuta-1,3-diene	000078-79-5	x	x	x					
Isobutanol	2-methylpropan-1-ol	000078-83-1		x	x	x	x	x		x
alcool isoamylique	3-methylbutan-1-ol	000123-51-3	x	x	x	x				
(+)-δ-cadinène	(1S,8aR)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2,3,5,6,8a-hexahydronaphthalene	000483-76-1		x	x	x				
α-ylangène	(1S,2R,6R,7R,8S)-1,3-dimethyl-8-(propan-2-yl)tricyclo[4.4.0.0 ^{2,7}]dec-3-ene	014912-44-8	x		x	x				
(+)-sativène	(1R,3aS,4R,7R,7aR)-4-methyl-8-methylene-7-(propan-2-yl)-octahydro-1H-1,4-methanoindene	003650-28-0	x	x	x	x	x	x	x	x
β-selinène	(3R,4aS,8aR)-8a-methyl-5-methylidene-3-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,4a,6,7,8-octahydronaphthalene	017066-67-0					x			x
(+)-aromadendrène	1,1,7-trimethyl-4-methylidene-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-octahydro-1aH-cyclopropa[e]azulene	000489-39-4	x	x	x	x		x	x	
Isolongifolène	2,2,7,7-tetramethyltricyclo[6.2.1.0 ^{1,6}]undeca-3,5,9-triene	001135-66-6						x		x

Tableau 5 (suite)

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions normales à 7 jours croissance ^c				COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions normales à 14 jours croissance ^d			
			1	2	3	4	1	2	3	4
α-élémane	(6S)-6-ethenyl-6-methyl-1-propan-2-yl-3-propan-2-ylidenecyclohexene	005951-67-7		x		x				
Longifolène	4,8,8-trimethyl-9-methylidenedecahydro-1,4-methanoazulene	000475-20-7	x	x	x	x	x		x	
β-patchoulène	(1S,4R,7R)-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4,9,9-tetramethyl-4,7-methanoazulene	000514-51-2	x		x					
α-cédrène	(1S,2R,5S,7R)-2,6,6,8-tetramethyltricyclo[5.3.1.0 ^{1,5}]undec-8-ene	000469-61-4		x		x				
Germacrène A	(1E,5Z,8S)-1,5-dimethyl-8-prop-1-en-2-ylcyclodeca-1,5-diene	075023-40-4	x	x	x	x				

a Liste des composés identifiés dans une colonne capillaire polaire VF-WAX.

b Nom IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) des composés.

c COVs émis par *C. sativus* cultivé en conditions normales à 7 jours de croissance par échantillon N=4.

d COVs émis par *C. sativus* cultivé en conditions normales à 14 jours de croissance par échantillon N=4.

1-4 échantillons

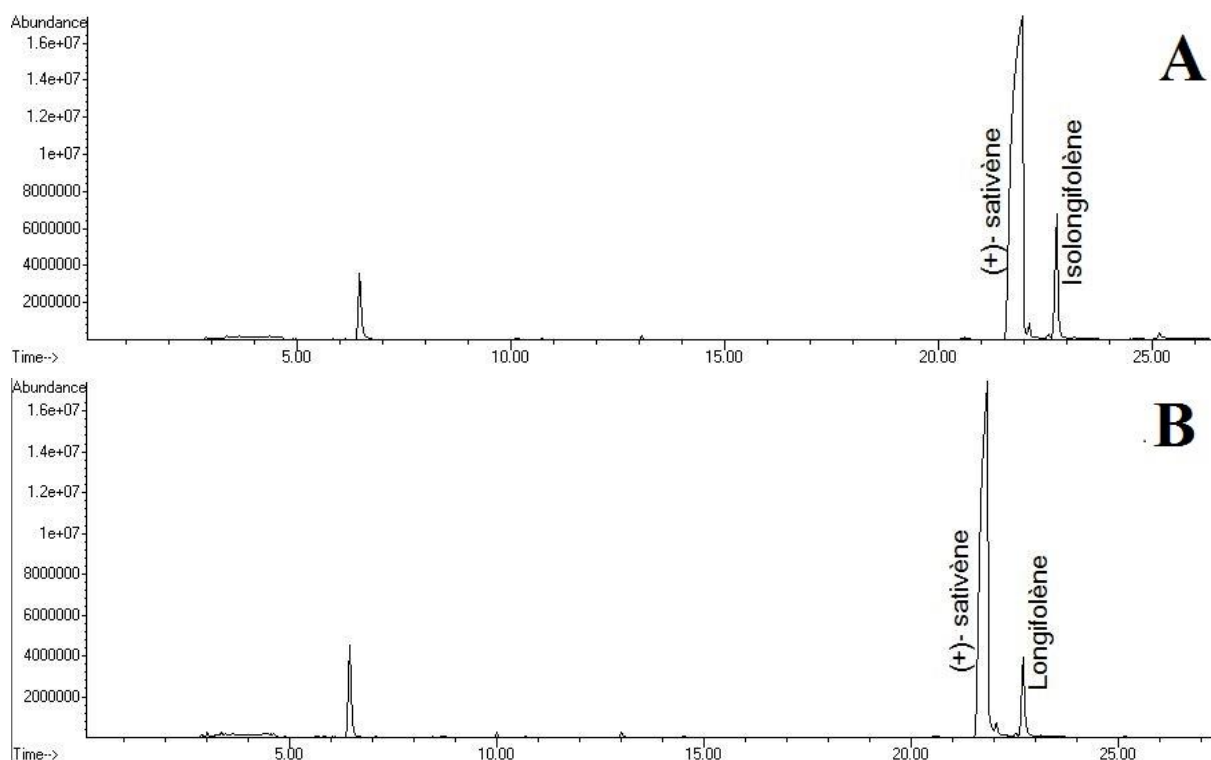


Figure 15 - Chromatogrammes des COVs émis par *C. sativus* cultivé en conditions normales à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance.

COVs émis par C. sativus en conditions de surpopulation à 10^6 spores/mL

Le tableau 7 reprend les COVs émis par *C. sativus* cultivé sous conditions de surpopulation à une concentration de 10^6 spores/mL.

Les composés identifiés sont au nombre de 15 à 7 jours et de 11 à 14 jours de croissance.

À 7 jours de croissance, les composés acétate d'éthyle, chloroforme, propan-1-ol, isobutanol, alcool isoamylique, (+)-sativène, (+)-aromadendrane, germacrène A et (-)- β -acoradiène se retrouvent dans au moins trois échantillons sur quatre. Le 2-méthylbutyrate d'éthyle, l' α -muurolène, l' α -selinène, l'isolongifolène, le longifolène et l' γ -muurolène sont identifiés dans deux échantillons sur quatre.

À 14 jours de croissance, les composés acétate d'éthyle, propan-1-ol, isobutanol, alcool isoamylique, germacrène A et D et l'(-)- β -acoradiène se retrouvent dans au moins trois échantillons sur quatre. Le 2-méthylbutyrate d'éthyle, l'acétoïne et le longifolène sont identifiés dans au moins deux échantillons sur quatre.

Les composés communs aux analyses à 7 et 14 jours de croissance sont l'acétate d'éthyle, le propan-1-ol, le 2-méthylbutyrate d'éthyle, d'isobutanol, l'alcool isoamylique le (+)-sativène, le longifolène, le germacrène A et le (-)- β -acoradiène.

Selon les chromatogrammes, les principaux pics correspondent à l'isobutanol, l'alcool isoamylique, le (+)-sativène et le isolongifolène à 7 jours de croissance (Figure 16.A) et l'isobutanol, l'alcool isoamylique, le (+)-sativène et le longifolène à 14 jours de croissance (Figure 16.B).

Un décalage de près de 2 unités de temps de rétention est visible entre le chromatogramme **A** et **B**.

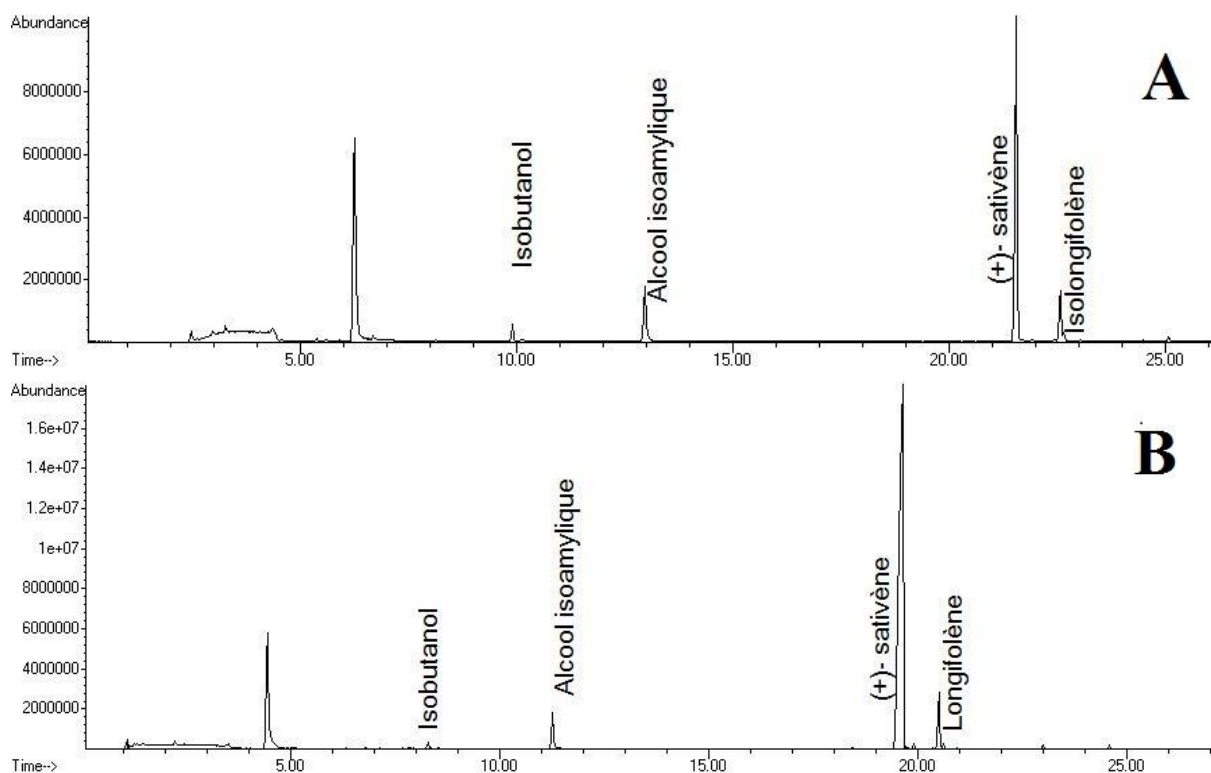


Figure 16 - Chromatogrammes des COVs émis par *C. sativus* cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours (**A**) et 14 jours (**B**) de croissance.

Tableau 6 - Liste des COVs émis par *C. sativus* en conditions de surpopulation à 7 et 14 jours de croissance pour chaque échantillon.

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions de surpopulation 10 ⁶ (spores/mL) à 7 jours croissance ^c				COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions de surpopulation 10 ⁶ (spores/mL) à 14 jours croissance ^d			
			1	2	3	4	1	2	3	4
Acétate d'éthyle	Ethyl acetate	000141-78-6	x	x	x	x	x	x	x	x
Chloroforme	Chloroform	000067-66-3		x	x	x				
Propan-1-ol	Propan-1-ol	000071-23-8	x	x		x	x	x	x	
2-méthylbutyrate d'éthyle	Ethyl 2-methylbutanoate	007452-79-1		x		x	x	x		
Isobutanol	2-methylpropan-1-ol	000078-83-1	x	x	x	x	x	x	x	x
Alcool isoamylique	3-methylbutan-1-ol	000123-51-3	x	x	x	x	x	x	x	x
Acétoïne	3-hydroxybutan-2-one	000513-86-0					x		x	
(+)-sativène	(1 <i>R</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-4-methyl-8-methylene-7-(propan-2-yl)-octahydro-1 <i>H</i> -1,4-methanoindene	003650-28-0	x	x		x	x	x	x	
α-murolène	(1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aR</i>)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -hexahydronaphthalene	031983-22-9	x			x				
Germacrène D	(1 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i>)-1-methyl-5-methylidene-8-propan-2-ylcyclodeca-1,6-diene	023986-74-5						x	x	x

Tableau 6 (suite)

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS	COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions de surpopulation 10 ⁶ (spores/mL) à 7 jours croissance ^c				COVs émis par <i>C. sativus</i> sous conditions de surpopulation 10 ⁶ (spores/mL) à 14 jours croissance ^d			
			1	2	3	4	1	2	3	4
(+)- aromadendrène	1,1,7-trimethyl-4-methylidene-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-octahydro-1aH-cyclopropa[e]azulene	000489-39-4	x	x		x				
α-selinène	(3R,4aR,8aR)-5,8a-dimethyl-3-prop-1-en-2-yl-2,3,4,4a,7,8-hexahydro-1H-naphthalene	000473-13-2		x	x					
Isolongifolène	2,2,7,7-tetramethyltricyclo[6.2.1.0 ^{1,6}]undeca-3,5,9-triene	001135-66-6			x	x				
Longifolène	4,8,8-trimethyl-9-methylidenedecahydro-1,4-methanoazulene	000475-20-7	x	x			x		x	
γ-muurolène	(1R,4aR,8aS)-7-methyl-4-methylidene-1-propan-2-yl-2,3,4a,5,6,8a-hexahydro-1H-naphthalene	030021-74-0			x	x				
Germacrène A	(1E,5Z,8S)-1,5-dimethyl-8-prop-1-en-2-ylcyclodeca-1,5-diene	075023-40-4	x	x	x	x	x	x	x	x
(-)-β-acoradiène	(1S,4R,5R)-1,8-dimethyl-4-prop-1-en-2-ylspiro[4.5]dec-8-ene	090457-37-7	x	x	x		x	x	x	

a Liste des composés identifiés dans une colonne capillaire polaire VF-WAX.

b Nom IUPAC (international Union of Pure and Applied Chemistry) des composés.

c COVs émis par *C. sativus* cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours de croissance par échantillon N=4.

d COVs émis par *C. sativus* cultivé en conditions de surpopulation à 14 jours de croissance par échantillon N=4.

1-4 échantillons

Synthèses des COVs identifiés et indices de Kovats

L'ensemble des composés obtenus pour les différents traitements est synthétisé dans le tableau 7. Ce tableau reprend l'ensemble des COVs identifiés en leur associant un nom commun, un nom IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un numéro CAS, un indice de Kovats calculé, un indice calculé pour les standards et l'indice de Kovats de référence. Les Indices de Kovats permettent une comparaison et une validation de l'identification des COVs obtenus avec la référence bibliographique. Les indices de Kovats de référence proviennent principalement du National Institute of Standard and Technology (NIST) et de la littérature scientifique.

Plusieurs points sont à relever dans ce tableau au sujet des indices de Kovats :

- Certains indices de Kovats n'ont pu être calculés car le temps de rétention était trop faible ou le pic de l'hydrocarbure (n-1 carbone) se retrouvait dans le pic du solvant des Kovats injectés.
- Pour les composés SCHEMBL7199818, Hexaméthylcyclotrisiloxane, 2,6-diméthylanisole, aucun indice Kovats de référence pour une colonne WAX n'a été trouvé.
- Les indices Kovats calculés ayant une étoile indiquent un écart supérieur à 10 unités avec l'indice Kovats de référence.

En tout, 44 composés ont été identifiés, principalement des sesquiterpènes, des aromatiques et quelques alcools, esters, cétones, monoterpènes et terpinoïdes.

Tableau 7 - Synthèse des COVs identifiés pour *F. culmorum* et *C. sativus* cultivé en milieu pauvre, en conditions normales et en surpopulation à 7 et 14 jours et calcul des indices de Kovats.

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS ^c	Rlcal ^d	Rlstd ^e	Rlref ^f	Identification ^g	Ref RI ^h
SCHEMBL7199818	8-(disulfanyl)naphthalen-1-amine	35373-06-9			/	MS, RI	
Hexaméthylcyclotrisiloxane	2,2,4,4,6,6-hexaméthyl-1,3,5,2,4,6-trioxatrisilane	541-05-9			/	MS, RI	
Pentane	Pentane	109-66-0			500	MS, RI	Chen et al, (1982)
Isoprène	2-méthylbuta-1,3-diene	78-79-5			602	MS, RI	NIST
Acétate d'éthyle	Ethyl acetate	141-78-6		900,6	900	MS, RI, STD	NIST
2-butanol	butan-2-one	78-93-3	989		988	MS, RI	NIST
Chloroforme	Chloroform	67-66-3	1006		1007	MS, RI	NIST
Toluène	Toluene	108-88-3	1021	1017	1020	MS, RI, STD	NIST
2-méthylbutyrate d'éthyle	Ethyl 2-méthylbutanoate	7452-79-1	1022		1022	MS, RI	NIST
Isovalérate d'éthyle	Ethyl 3-méthylbutanoate	108-64-5	1049		1049	MS, RI	NIST
Isobutanol	2-méthylpropan-1-ol	78-83-1	1061,5		1060	MS, RI	NIST
Sabinène	4-méthylidène-1-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hexane	3387-41-5	1242 *		1134	MS, RI	NIST

Tableau 7 (suite 1)

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS ^c	Rical ^d	Rlstd ^e	Rlref ^f	Identification ^g	Ref RI ^g
p-xylène	1,4-xylene	106-42-3	1066		1165	MS, RI	NIST
Acétate d'isoamyle	3-methylbutyl acetate	123-92-2	1169	1185,6 *	1167	MS, RI, STD	NIST
Alcool isoamylique	3-methylbutan-1-ol	123-51-3	1201	1200,7	1201	MS, RI, STD	NIST
β-phellandrène	3-methylidene-6-propan-2-ylcyclohexene	555-10-2	1202,9		1202	MS, RI	NIST
2-méthylbutanol	2-methylbutan-1-ol	137-32-6	1208		1208	MS, RI	NIST
Mésitylène	1,3,5-trimethylbenzene	108-67-8	1246,6		1246	MS, RI	NIST
Pseudocumène	1,2,4-trimethylbenzene	95-63-6	1248,5		1249	MS, RI	NIST
1-pentanol	Pentan-1-ol	71-41-0	1270	1249	1260	MS, RI, STD	NIST
Acétoïne	3-hydroxybutan-2-one	513-86-0	1285,9		1286	MS, RI	NIST
Hémellitol	1,2,3-trimethylbenzene	526-73-8	1317,5		1320,6	MS, RI	NIST
2,6-diméthylanisole	2-methoxy-1,3-dimethylbenzene	1004-66-6	1397,059		/	MS, RI	
α-ylangène	(1S,2R,6R,7R,8S)-1,3-dimethyl-8-(propan-2-yl)tricyclo[4.4.0.0 ^{2,7}]dec-3-ene	14912-44-8	1607 *		1502	MS, RI	NIST
β-patchoulène	(1S,4R,7R)-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4,9,9-tetramethyl-4,7-methanoazulene	514-51-2	1636 *		1518	MS, RI	NIST

Tableau 7 (suite 2)

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS ^c	Rical ^d	Rlstd ^e	Rlref ^f	Identification ^g	Ref RI ^g
(+)-Sativène	(1 <i>R</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aR</i>)-4-méthyl-8-méthylène-7-(propan-2-yl)-octahydro-1 <i>H</i> -1,4-methanoindène	3650-28-0	1524,5	1536,9	1527	MS, RI, STD	NIST
Longifolène	4,8,8-triméthyl-9-méthylidenedecahydro-1,4-methanoazulène	475-20-7	1589,6	1600,5	1590	MS, RI, STD	NIST
Isolongifolène	2,2,7,7-tetraméthyltricyclo[6.2.1.0 ^{1,6}]undeca-3,5,9-triène	1135-66-6	1584 *		1608	MS, RI	NIST
α-cedrène	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-2,6,6,8-tetraméthyltricyclo[5.3.1.0 ^{1,5}]undec-8-ène	469-61-4	1692 *		1608	MS, RI	NIST
Epi-bicycloséquihellandrène	(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-méthyl-7-méthylidène-1-propan-2-yl-2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6-hexahydro-1 <i>H</i> -naphthalène	54324-03-7	1627,7		1633	MS, RI	NIST
(+)-Aromadendrène	1,1,7-triméthyl-4-méthylidène-2,3,4 <i>a</i> ,5,6,7,7 <i>a</i> ,7 <i>b</i> -octahydro-1 <i>aH</i> -cyclopropa[<i>e</i>]azulène	489-39-4	1652,9		1650	MS, RI	Davies (1990)
β-selinène	(3 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,8 <i>aR</i>)-8 <i>a</i> -méthyl-5-méthylidène-3-prop-1-en-2-yl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,6,7,8-octahydronaphthalène	17066-67-0	1652,4 *		1666	MS, RI	NIST
γ-muuroène	(1 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,8 <i>aS</i>)-7-méthyl-4-méthylidène-1-propan-2-yl-2,3,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -hexahydro-1 <i>H</i> -naphthalène	30021-74-0	1674,4		1675	MS, RI	NIST
α-élémente	(6 <i>S</i>)-6-éthényl-6-méthyl-1-propan-2-yl-3-propan-2-ylidénecyclohexène	5951-67-7	1646 *		1685	MS, RI	NIST
α-acoradiène	(1 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1,8-diméthyl-4-prop-1-en-2-ylspiro[4.5]dec-8-ène	24048-44-0	1661,7 *		1690	MS, RI	Rolhoff et Bones (2005)

Tableau 7 (suite 3)

Composés ^a	Noms IUPAC ^b	CAS ^c	RIcal ^d	RIstd ^e	RIref ^f	Identification ^g	Ref RI ^h
(-)- β -acoradiène	(1S,4R,5R)-1,8-dimethyl-4-prop-1-en-2-ylspiro[4.5]dec-8-ene	090457-37-7	1687,4		1693	MS, RI	NIST
α -selinène	(3R,4aR,8aR)-5,8a-dimethyl-3-prop-1-en-2-yl-2,3,4,4a,7,8-hexahydro-1H-naphthalene	473-13-2	1649 *		1724	MS, RI	NIST
α -muurolène	(1S,4aS,8aR)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2,4a,5,6,8a-hexahydronaphthalene	31983-22-9	1562,5 *		1727	MS, RI	Davies (1990)
Germacrène A	(1E,5Z,8S)-1,5-dimethyl-8-prop-1-en-2-ylcyclodeca-1,5-diene	75023-40-4	1744,9		1745	MS, RI	NIST
α -chamigrène	(6R)-1,5,5,9-tetramethylspiro[5.5]undeca-1,9-diene	19912-83-5	1652,4 *		1753	MS, RI	NIST
(+)- δ -cadinène	(1S,8aR)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2,3,5,6,8a-hexahydronaphthalene	483-76-1	1570,5 *		1767	MS, RI	NIST
2-phényléthanol	2-phenylethanol	60-12-8	1924		1924	MS, RI	NIST

a Liste de composés par ordre d'élution dans une colonne capillaire polaire VF-Wax.

b Nom IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) des composés.

c Numéro CAS (Chemical Abstracts Service).

d Indices de Kovats calculés sur une colonne capillaire polaire VF-Wax avec une série homologue de n-alcanes (C8-C24).

e Indices de Kovats calculés pour les standards sur une colonne capillaire polaire VF-Wax avec une série homologue de n-alcanes (C8-C24).

f Indice de Kovats de référence dans la littérature.

g Proposition d'identification : **MS**, identification en par comparaison des masses spectrales avec les bases de données Wiley275, pal600k et NBS75K ; **RI**, identification par les indices de rétention avec les données de la littérature ; **STD**, comparaison avec les temps de rétentions et les masses spectrales de standards disponibles.

h Référence.

4.1.2. Comparaison des composés organiques volatils émis dans les différents traitements

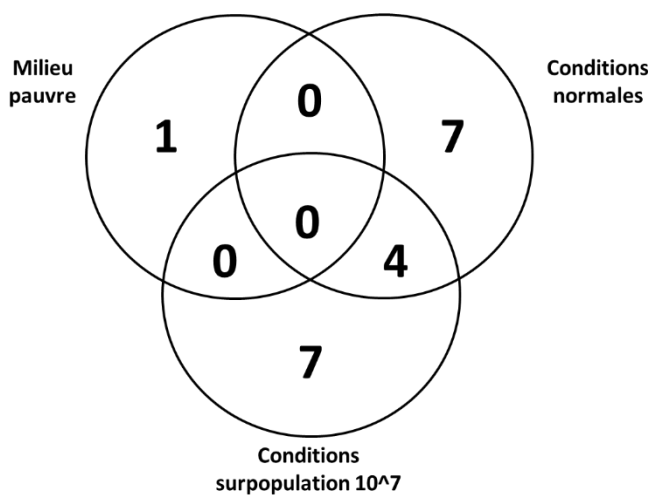
Les diagrammes suivants (Figure 23 **A** à **D**) permettent de comparer le nombre de composés organiques volatils émis par *F. culmorum* (Figure **A** et **B**) et *C. sativus* (Figure **C** et **D**) à 7 et 14 jours de croissance pour les trois traitements étudiés.

Les diagrammes montrent plusieurs similitudes au niveau du nombre de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus*. Tout d'abord, le nombre de COVs émis après 7 jours de croissance est supérieur au nombre émis après 14 jours de croissance. Ensuite, le nombre de COVs émis pour le traitement sous conditions de surpopulation est supérieur aux deux autres traitements autant à 7 jours qu'à 14 jours de croissance. Enfin, dans toutes les situations, des COVs sont communs entre deux ou trois traitements.

Pour *C. sativus*, le nombre de COVs émis est globalement supérieur au nombre de COVs émis par *F. culmorum* pour chaque traitement aussi bien à 7 jours qu'à 14 jours de croissance. C'est uniquement chez *C. sativus* que des COVs communs aux trois traitements sont retrouvés.

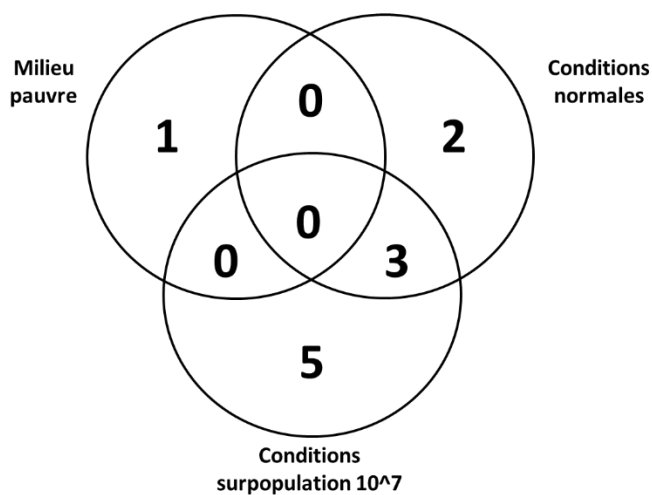
Aucun COVs n'est commun aux deux champignons cultivés sur un milieu pauvre. Pour une culture en conditions normales, l'alcool isoamylique se retrouve chez les deux souches à 7 jours de croissance et l'isobutanol se retrouve à 7 et 14 jours de croissance. Pour une culture en conditions de surpopulation, l'alcool isoamylique se retrouve également chez les deux champignons à 7 jours tandis que l'acétate d'éthyle, le 2-méthylbutyrate d'éthyle et l'isobutanol se retrouvent à 7 et 14 jours de croissance pour les deux souches étudiées.

Répartition des composés organiques volatils émis par *F. culmorum* à 7 jours d'inoculation



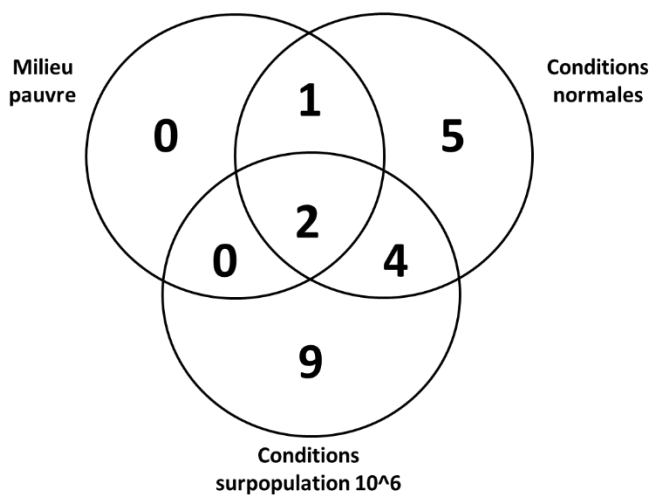
A

Répartition des composés organiques volatils émis par *F. culmorum* à 14 jours d'inoculation



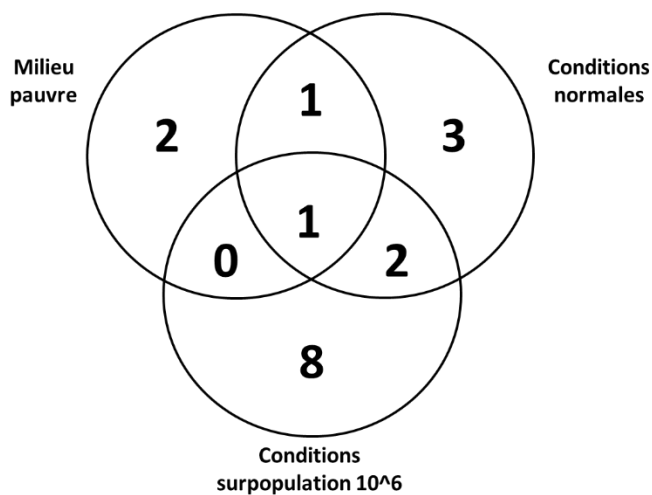
B

Répartition des composés organiques volatils émis par *C. sativus* à 7 jours d'inoculation



C

Répartition des composés organiques volatils émis par *C. sativus* à 14 jours d'inoculation



D

Figure 17 - Comparaison entre traitements du nombre de COVs émis par *F. culmorum* à 7 jours (A) et 14 jours (B) de croissance ; et par *C. sativus* à 7 jours (C) et 14 jours (D) de croissance.

4.1.3. Discussion

Identification des COVs

Dans cette étude préliminaire, il est intéressant de savoir si les composés identifiés sont déjà cités dans la littérature comme composé émis par des champignons ou bactéries. Cette recherche permet d'assurer que les composés identifiés peuvent être d'origine microbienne.

Le pentane, l'isoprène, l'acétate d'éthyle, le 2-butanol, le toluène, le 2-méthylbutyrate d'éthyle, l'isovalérate d'éthyle, l'isobutanol, le propan-1-ol, le sabinène, le p-xylène, l'alcool isaomylique, le 2-méthylbutanol, le pseudocumène, l'acétoïne, l' α -ylangène, l'(+)-aromadendrène, le γ -muurolène λ β -selinène, le germacrène A, le (+)- δ -cadinène et le 2-phényléthanol sont connus pour être émis par des bactéries et/ou champignons et par des plantes. Ils sont répertoriés dans les bases de données mVOC et Phérobases. Par exemple, le toluène est émis par plusieurs espèces de champignons du genre *Tuber* et des bactéries comme *Pseudomonas fragi* 25P et *Carnobacterium divergens* 9 (Lemfack et al., 2014). Le toluène est aussi émis par des plantes des familles *Araceae*, *Orchidaceae*, *Caryophyllaceae*, *Actinidiaceae*, *Bombacaceae*, *Rosaceae* ou encore *Meliaceae* ("The Pherobase," n.d.).

Les composés acétate d'isoamyle, 1-pentanol, α -Muurolène, α -chamigrène sont répertoriés comme composés émis par les champignons (Lemfack et al., 2014) tandis que les composés chloroforme, β -phellandrène, héméllitol, (-)- β -acoradiène, β -Patchoulène, (+)-sativène, longifolène, isolongifolène, α -cédrène, α -élémyène, α -acoradiène, germacrène D, α -selinène et mésitylène sont, quant à eux, répertoriés comme composés émis par des plantes ("The Pherobase," n.d.). Pour ces derniers composés, ceci ne confirme pas l'absence d'émission par des agents microbiens. En effet, la base de données mVOC n'est pas exhaustive et se complète au fur et à mesure des recherches scientifiques.

Seuls 4 composés, le SCHEMBL7199818, l'hexaméthylcyclotrisiloxane, le 2,6-diméthylanisole, l'épi-bicyclosesquiphellandrène ne se retrouvent ni dans la base de données mVOC ni dans celle de Phérobases. Toutefois, l'épi-bicyclosesquiphellandrène est identifié dans les composés des huiles essentielles chez *Acinos alpinus* (Skaltsa et al., 1999) et de *Conchocarpus fontanesianus* (Cabral et al., 2016).

Les composés hexaméthylcyclotrisiloxane et SCHEMBL7199818 identifiés chez *F. culmorum* cultivé sur un milieu pauvre possèdent une qualité d'identification par le GC-MS supérieure à 80 et ne sont pas retrouvés dans les différents contrôles associés à cette analyse. Ils remplissent donc nos critères et ont été considérés dans notre analyse. Toutefois, ces

composés sont retrouvés dans les contrôles des autres traitements. De plus, le composé hexamethylcyclotrisiloxane pourrait provenir de la dégradation de la fibre SPME que nous utilisons, contenant une phase de Polydiméthylsiloxane (PDMS) (Parker et al., 2014). Leur origine fongique n'est donc pas certaine.

Aucune information n'a été trouvée concernant le 2,6-diméthylanisole, son origine fongique est donc encore à démontrer.

Cette discussion permet de voir que 41 composés sur les 44 que nous avons identifiés sont déjà connus pour être émis par des champignons, bactéries ou plantes.

La comparaison de nos résultats avec d'autres recherches qui étudient les mêmes genres de champignons pourrait être intéressante dans l'identification des composés.

Dans l'étude de Savelieva et al. (2016) qui identifie les COVs émis par 4 espèces de champignons du genre *Fusarium* (*F. langsethiae*, *F. sibiricum*, *F. poae* et *F. sporotrichoides*), cinq composés communs avec ceux de notre étude sont identifiés pour *F. culmorum*: l'alcool isoamylique, l'isobutanol, le 2-méthylbutyrate d'éthyle, l'isovalérate d'éthyle ou encore l' α -chamigrène. Cinq COVs communs sont également retrouvés par l'étude de Savel'eva et al. (2014), qui ont aussi étudié l'espèce *F. culmurom* : l'isobutanol, le l'alcool isoamylique, l'acétate d'éthyle, 1- pentanol et le β -phellandrène. Buko et al. (2014), quant à eux, ont étudié 27 souches de *F. graminearum*, et quatre composés sont communs avec notre étude, 1- pentanol, p-xylène, mésitylène et pseudocumène. Peu d'études sont réalisées sur le genre *Cochliobolus*. Cette comparaison avec d'autres espèces du genre *Fusarium* montre que peu de COVs sont communs.

Une dernière comparaison est faite avec l'étude de Fiers et al. (2013) dont les conditions sont proches de la nôtre. Les COVs identifiés pour *F. culmorum* et *C. sativus* sont assez différents de ceux de notre étude. Seuls trois composés (isobutanol, 2-méthylbutanol et alcool isoamylique) se retrouvent en commun avec les COVs identifiés pour *F. culmorum*, et huit composés pour *C. sativus* (isobutanol, 2-methylbutanol, (+)-sativène, longifolène, β -acoradiène, α -muurolène, germacrène A et 2-phényléthanol).

Plusieurs explications peuvent être formulées quant à la différence de COVs émis dans les différentes études et particulièrement par rapport à celle de Fiers et al. (2013). Tout d'abord, l'étude de Fiers et al. (2013) identifie les COVs émis uniquement en conditions de croissances normales. La supériorité du nombre de COVs identifiés par rapport à l'étude de Fiers et al. (2013) pourrait s'expliquer par l'identification des COVs émis en situation de stress. Plusieurs études montrent en effet que les COVs émis dépendent de l'espèce fongique et des conditions de culture (Hussain et al., 2010; Savelieva et al., 2016).

Ensuite, plusieurs variations peuvent être liées aux méthodes d'analyse choisies. Au niveau de la machine GC-MS, les variations se remarquent par la qualité de l'identification. La machine étant partagée entre plusieurs utilisateurs, les manipulations de changement de colonne à répétition mènent à des variations d'analyses comme un bruit de ligne de base excessif, des pics à épaulement avant, des trainées de pics ou encore une perte de résolution (Agilent Technologies, n.d.). Ces variations se répercutent sur la qualité des chromatogrammes et donc sur l'identification des composés.

De plus, l'identification des COVs dépend aussi de la méthode d'extraction. En effet, les COVs obtenus dépendent de la fibre et de la méthode d'extraction choisie (Jelen, 2003; Tait et al., 2014). Les fibres SPME utilisées sont constituées d'une surface adsorbante qui possède plus ou moins d'affinité avec certains composés (Hung et al., 2015). Cette information met en garde sur les composés obtenus et la recherche éventuelle de nouveaux composés. Dans cette même optique, les COVs identifiés dépendent aussi des bases de données utilisées lors de l'identification des composés.

Enfin, d'autres variations peuvent survenir dans la préparation des échantillons, notamment par rapport au choix de la méthode de calcul de concentration des spores ou une contamination des vials par des composés présents dans l'air ambiant. Pour minimiser la contamination des vials, ces derniers sont lavés suivant un protocole précis décrit à la section 3.3.1, et de nombreux contrôles sont réalisés pour chaque analyse. Le type de substrat choisi pour la culture des champignons joue aussi un rôle dans le type de COVs émis (Ezra et al., 2003; Tait et al., 2014; Savelieva et al., 2016). Ezra et al. (2003) ont montré que plus le milieu était enrichi en saccharose plus les COVs émis par *Muscodor albus* avaient des propriétés anti-fongiques.

En effet, les champignons sont les plus grands dégradeurs de la planète et produisent un grand nombre d'enzymes extracellulaires hydrolytiques et autres enzymes. Ces enzymes sont capables de dégrader des macromolécules. Tous les COVs associés à une espèce de champignon ne proviennent donc pas nécessairement d'un processus anabolique mais peuvent venir d'une production de destruction extracellulaire produite dans un substrat donné. (Hung et al., 2015)

Un des objectifs de notre étude est de savoir si les composés émis par nos champignons dans différentes conditions de croissance pourraient avoir des propriétés anti-fongiques ou anti-bactériennes. Nous avons constaté que, dans la littérature, peu d'études étaient menées sur les effets individuels des composés organiques volatils en tant qu'anti-fongique ou anti-bactérien.

Toutefois, plusieurs composés de notre étude se retrouvent identifiés dans des huiles essentielles et dans les bouquets de certains microorganismes qui possèdent des propriétés anti-fongiques ou anti-bactériennes. Par exemple, l'isolongifolène, l'(+)-aromadendrène, le germacrène A et D et le (+)- δ -cadinène sont connus pour être des composants des huiles essentielles extraites de *Moringa oleifera* Lam, *Tetradenia riparia*, *Piper aduncum*, *Piper arboreum*, *Piper tuberculatum* et *chromolaena odorata*. Ces huiles montrent des effets inhibiteurs sur la croissance de pathogènes comme *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Pyricularia grisea*, *Phytophthora nicotianae* ou encore *Fusarium oxysporum* (B et al., 2003; Navickiene et al., 2006; Chuang et al., 2007; Jeong Ho Lee et al., 2008; Ioshida et al., 2010; Nathalya Isabel de Melo et al., 2015; Idris et al., 2017).

L'activité anti-microbienne de certaines huiles essentielles n'est plus à démontrer. L'identification des COVs de ces huiles laisse entrevoir que certains composés obtenus pourraient avoir un potentiel anti-fongique ou anti-bactérien, ce qui pourrait motiver la recherche des composés responsables de ces effets.

Dans notre étude, les composés acétate d'éthyle, acétate d'isoamyle, alcool isoamylique, isobutanol, longifolène, 1-pentanol, (+)-satiève et le toluène semblent particulièrement prometteurs et ont été sélectionnés pour être testés individuellement dans la suite de nos expérimentations (voir section 4.3.3).

Cependant, plusieurs précautions sont à prendre en compte lors de l'interprétation de nos résultats. La première concerne la panne du GC-MS survenue le 3 avril 2017. À la suite de l'arrêt de la machine, deux observations ont pu être mises en évidence. Premièrement, une différence se remarque entre le nombre et le type de composés identifiés dans les deux répétitions des analyses des COVs émis par *F.culmorum*, cultivé en conditions de surpopulation à 7 jours (le 29 mars et le 25 avril). Deuxièmement, l'aspect des chromatogrammes avant et après l'arrêt de la machine est également différent (Figure 12 et 13).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises.

Tout d'abord, les observations et surtout la différence des COVs identifiés pourraient s'expliquer par des moments d'inoculation différents (4 semaines d'écart) où plusieurs paramètres comme les contaminations, la température, l'humidité et la lumière ont pu jouer un rôle.

Ensuite, l'arrêt de la machine GC-MS, qui s'est produit entre les deux analyses, a pu provoquer une amélioration de la sensibilité de la machine ou une modification de la méthode utilisée. En effet, une vérification de la méthode avant et après l'arrêt montre que certains paramètres de détection ont changé (ANNEXE II). Ces paramètres de détection n'ont pas

globalement changé la méthode, mais deux changements peuvent expliquer les différences entre les résultats avant et après l'arrêt. Les paramètres de la colonne 2 ont été supprimés. Ils avaient pour fonction de séparer le flux de gaz vers différents détecteurs dont celui du spectre de masse. Ensuite, le paramètre « gain factor » a été majoré, ce qui a augmenté le signal de détection. Ces deux hypothèses peuvent expliquer l'augmentation de sensibilité de la détection au niveau des chromatogrammes.

La deuxième précaution concerne les variations que nous avons observées lors de nos calculs des indices de Kovats (Figure 8). L'indice de Kovats est une constante indépendante qui permet de valider l'identification d'un composé en le comparant avec son indice de Kovats de référence. Ces deux indices doivent être les plus proches possibles, et un seuil de 10 unités d'écart a été défini empiriquement.

Dans le tableau de synthèse, 15 indices de Kovats calculés possèdent un écart de plus de 10 unités avec l'indice de Kovats de référence.

Pour le β -selinène et le standard de l'acétate d'isoamyle, les différences avec la référence sont respectivement de 13,6 et 18,6. Cet écart supérieur à 10 pourrait s'expliquer par le choix de l'indice de Kovats de référence. La littérature répertorie peu d'indices pour une colonne VF-WAX. Les valeurs de référence choisies ne se réfèrent donc pas totalement à la colonne utilisée lors de l'identification mais s'en rapprochent en choisissant des références d'indice Kovats pour des colonnes polaires WAX. De plus, la qualité de ces deux composés est supérieure à 90. Ils sont retrouvés dans plusieurs répétitions avec des paramètres d'identification similaires, ce qui plaide pour une bonne identification.

Pour les composés sabinène, α -ylangène, β -patchoulène, germacrène D, α -muurolène, α -chamigrène et (+)- δ -cadinène, la différence avec l'indice de référence est supérieure à 100 unités. Cet écart important combiné à une qualité inférieure ou égale à 90 suggère une identification erronée.

Toutefois, le germacrène D et l' α -chamigrène possèdent des qualités respectives de 94 et 95 et se retrouvent dans trois répétitions sur quatre. Ces valeurs de qualité élevées, associées à une différence importante entre les indices de Kovats compliquent l'interprétation. Pour ces deux composés, l'identification pourrait être validée bien qu'empiriquement le seuil de 10 unités d'écart entre l'indice calculé et l'indice de référence ait été instauré. En effet, l'étude de Nuyssen et al. (2014) suggère que pour une colonne polaire, les écarts observés entre les indices de référence et calculés pour une colonne polaire étaient plus élevés et pouvaient aller jusqu'à 100 unités.

Une hypothèse qui permettrait d'expliquer l'écart important entre les indices calculés et les indices de référence serait la présence préalable de composés à l'état de trace sur la colonne, ce qui engendrerait une mauvaise identification des composés contaminants (Agilent Technologies, n.d). Une autre hypothèse est liée au nombre d'injection de Kovats réalisées. Dans cette étude, deux injections de Kovats ont été réalisées avec 11 semaines d'écart (début et fin des expériences). Idéalement, il aurait fallu injecter des Kovats après chaque analyse. Part ailleurs, une différence systématique de près de 2 unités est visible sur les temps de rétentions des Kovats entre les deux injections réalisées. Cette différence se remarque aussi au niveau des chromatogrammes des COVs émis par *C. sativus* en conditions de surpopulation (Figure 16.A et B). Cette variation pourrait s'expliquer par un changement de débit du gaz vecteur (Agilent Technologies, n.d), et conduire à des erreurs lors des calculs des indices Kovats.

Le longifolène, α -cedrène, α -acoradiène possèdent un écart inférieur à 100 unités et une qualité supérieure à 90. La différence entre les indices de Kovats pourrait se justifier par l'acceptation d'un écart pouvant aller jusqu'à 100 unités pour une colonne polaire. L' α -élémane et l' α -selinène possèdent une qualité inférieure à 80. La différence entre l'indice calculé et l'indice de référence pourrait suivre l'hypothèse des variations d'utilisation de la machine GC-MS.

Pour les COVs à l'identification incertaine, les ions majoritaires des spectres de masse ont été comparés avec la littérature. Ainsi, même si les indices de Kovats calculés sont très différents des indices de référence, l'identification du α -ylangène, β -patchoulène, (+)- δ -cadinène, longifolène, α -cedrène et α -acoradiène pourrait être acceptée car leurs ions majoritaires correspondent. A l'inverse, le sabinène, α -chamigrène et le α -selinène possèdent des ions majoritaires assez différents de ceux des composés détectés dans notre étude, ce qui pourrait confirmer une erreur d'identification. Les spectres de masse du germacrène D, α -muurolène, α -élémane et le β -selinène n'ont pas pu être comparés à cause de leur pic trop faible sur le chromatogramme.

Comparaison des COVs

La supériorité du nombre de COVs émis à 7 jours de croissance avait déjà été observée dans l'étude de Fiers et al. (2013) montrant que le jour d'émission de COVs le plus important pour *F. culmorum* et *C. sativus* se situait à 7 jours. Cette étude montre aussi que, comme nous l'avons observé, *C. sativus* émet plus de COVs que *F. culmorum*.

La présence de COVs communs entre les différents traitements suggère qu'il pourrait exister une « base » de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* en toutes circonstances. Schleibinger et al. (2002) ont montré que le 3-méthyl-2-butanol, 1-octène-3-ol et 2-éthyl-1-hexanol sont émis par cinq souches différentes d'*Aspergillus versicolor*. Savelieva et al. (2016) ont aussi montré que les composés 3-méthylfuran, éthyle acétate, butanol, α -acoradiène et le trichodiène se retrouvent dans les émissions de quatre espèces différentes du genre *Fusarium* (*F. langsethiae*, *F. sibiricum*, *F. poae* et *F. sporotrichoides*) cultivés sur deux substrats différents. Ces bases communes de COVs pourraient définir un marqueur d'une espèce fongique. Cette voie a été explorée dans la recherche de moisissure des bâtiments (Kuske et al., 2005; Polizzi et al., 2012). Lorenz (2001) a déterminé huit COVs marqueurs de moisissure dans l'air intérieur.

La supériorité du nombre de COVs émis sous conditions de surpopulation aussi bien pour *F. culmorum* que pour *C. sativus* pourrait se justifier par le mécanisme de *quorum sensing* développé à la section 1.2.2 qui enclenche l'émission de COVs liée à une densité trop élevée.

4.2. Effets des bouquets de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* sur leur croissance respective

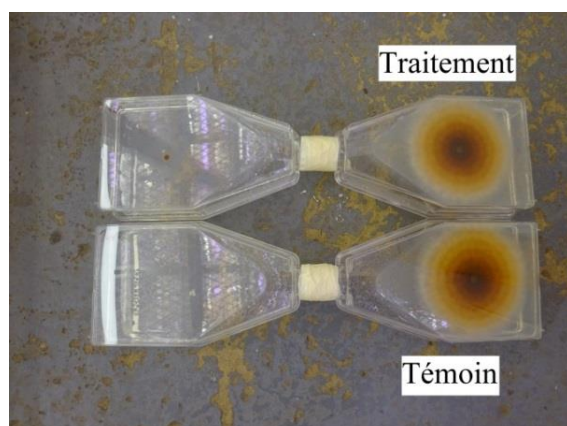
4.2.1 Effets du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de *F. culmorum* cultivé en conditions normales

Les effets du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de *F. culmorum* cultivé en conditions normales après 7 jours de croissance sont illustrés dans les figures 18.A et 18.B.

Aucune différence visuelle n'est observée quant à la morphologie du champignon entre les objets traités et les témoins.

L'analyse statistique montre une absence de différence significative entre la croissance du témoin et celle du traitement, sauf pour la croissance au jour 2.

A



* différences significatives ($P = 0,05$)
entre le traitement et le contrôle.
Barres d'erreur = écarts-types ; $N=8$

B

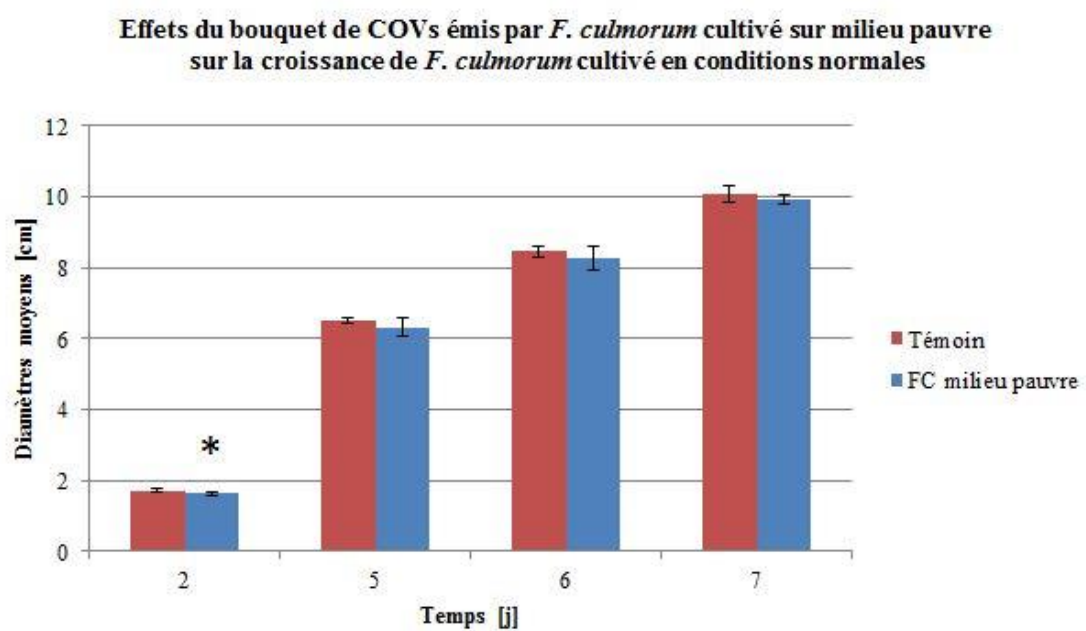


Figure 18 - Effets du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* (FC) cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de *F. culmorum* cultivé en conditions normales. **A.** Photo des effets au 7ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *F. culmorum* au cours du temps.

4.2.2. Effets du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de *F. culmorum* cultivé en conditions normales

Les effets du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de *F. culmorum* en conditions normales après 7 jours de croissance sont illustrés dans les figures 19.A et 19.B.

Une différence de taille et de pigmentation peut être déterminée visuellement.

L'analyse statistique confirme une différence significative de croissance avec le témoin dès le 5^{ème} jour de croissance. La tendance se confirme par la suite.

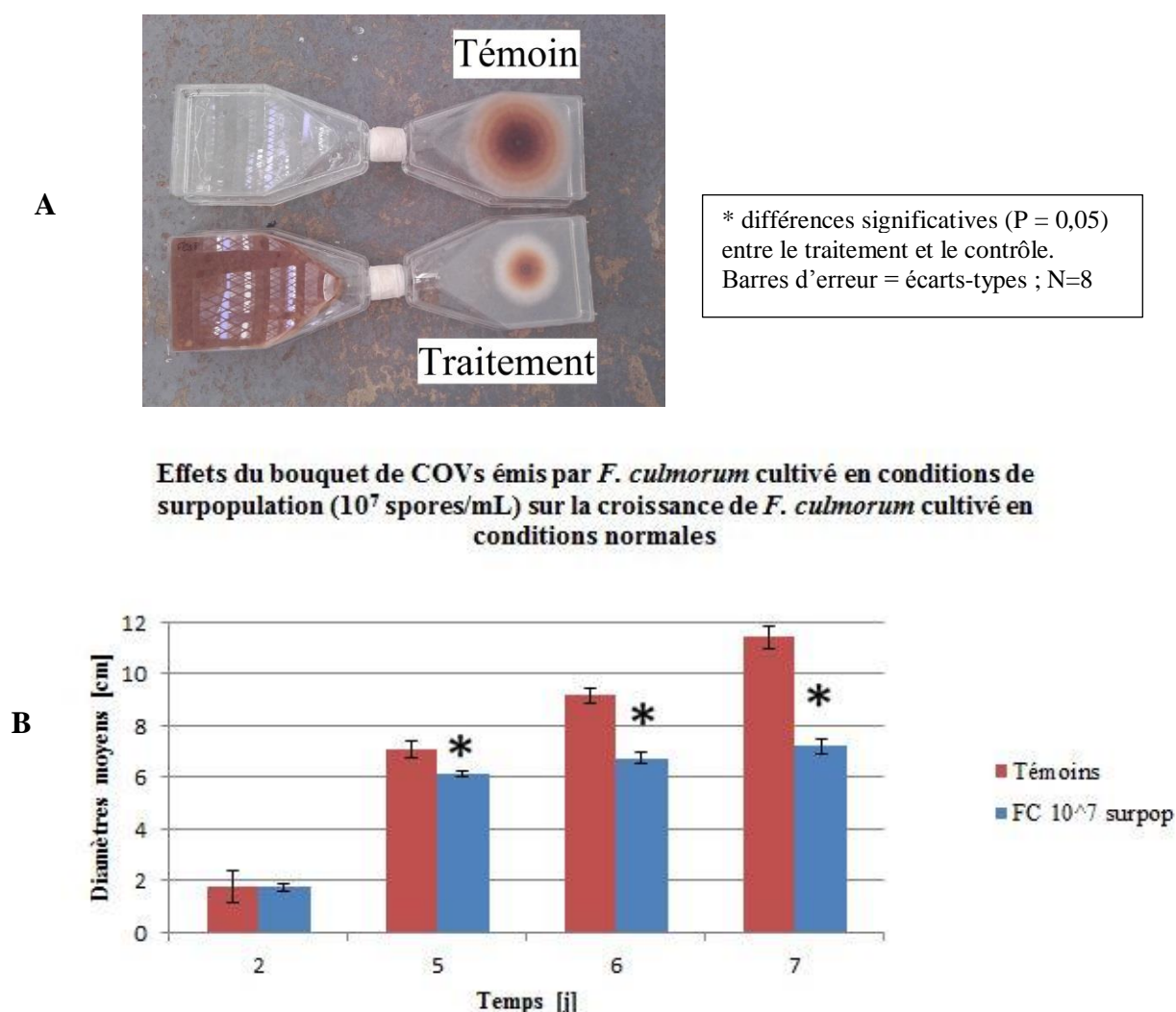


Figure 19 - Effets du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* (FC) cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de *F. culmorum* cultivé en conditions normales. **A.** Photo des effets au 7ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *F. culmorum* au cours du temps.

4.2.3. Effets du bouquet de COVs émis par *C. sativus* cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de *C. sativus* cultivé en conditions normales

Les effets du bouquet de COVs émis par *C. sativus* cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de *C. sativus* cultivé en conditions normales après 13 jours de croissance sont illustrés dans les figures 20.A et 20.B.

Aucune différence visuelle n'est observée et aucune statistique significative de croissance n'est démontrée entre le témoin et le traitement pour toute la durée de l'expérience.

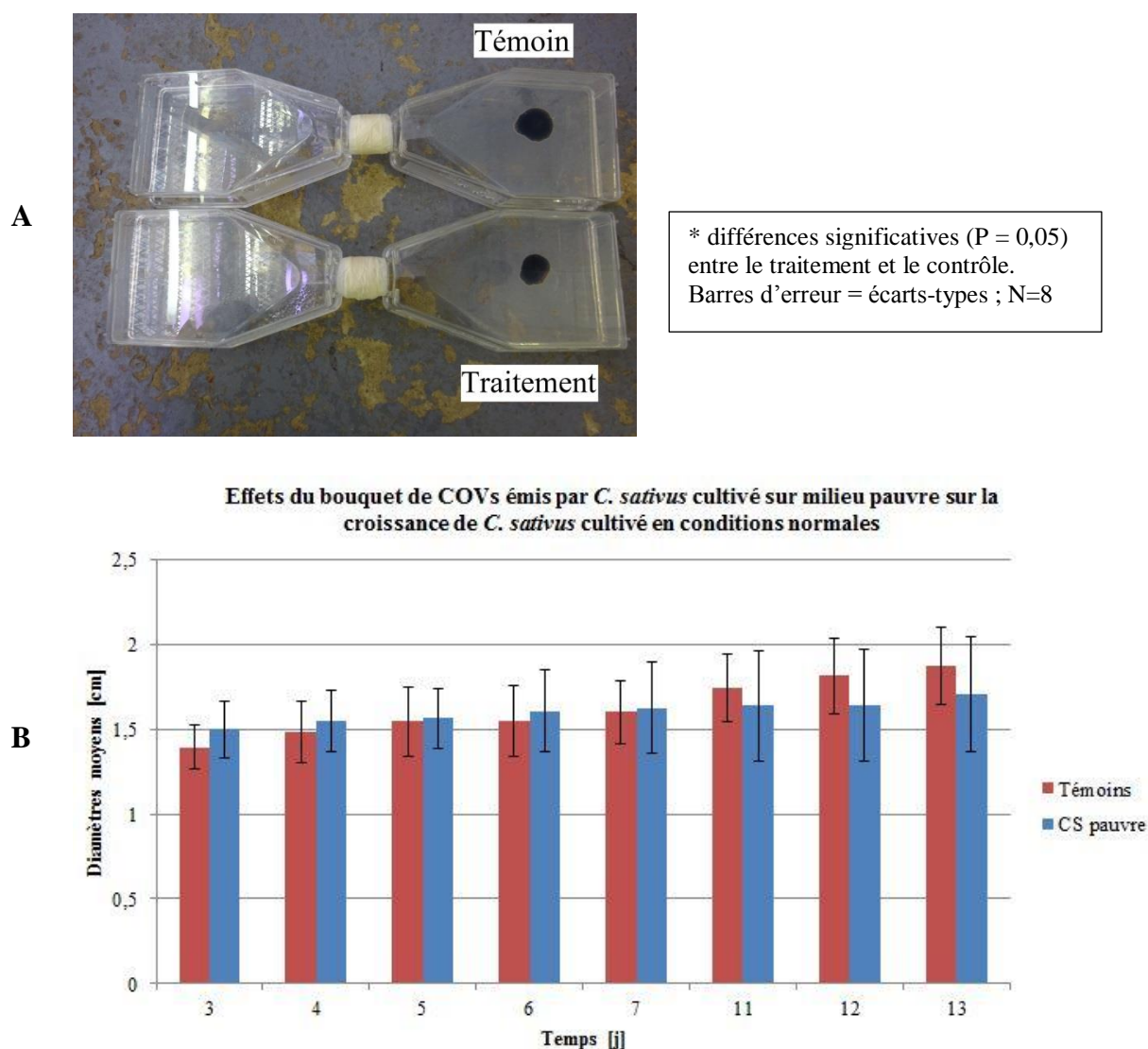


Figure 20 - Effets du bouquet de COVs émis par *C. sativus* (CS) cultivé sur un milieu pauvre sur la croissance de *C. sativus* cultivé en conditions normales. **A.** Photo des effets au 13ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *C. sativus* au cours du temps.

4.2.4. Effets du bouquet de COVs émis par *C. sativus* cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de *C. sativus* cultivé en conditions normales

Les effets du bouquet de COVs émis par *C. sativus* en conditions de surpopulation sur la croissance de *C. sativus* cultivé en conditions normales après 14 jours de croissance sont illustrés dans les figures 21.A et 21.B.

Sur la photo, aucune différence visuelle n'est observée.

L'analyse statistique, quant à elle, montre une différence significative de croissance entre le témoin et le traitement à partir du 9^{ème} jour de croissance. La tendance est gardée jusqu'à la fin de l'expérience.

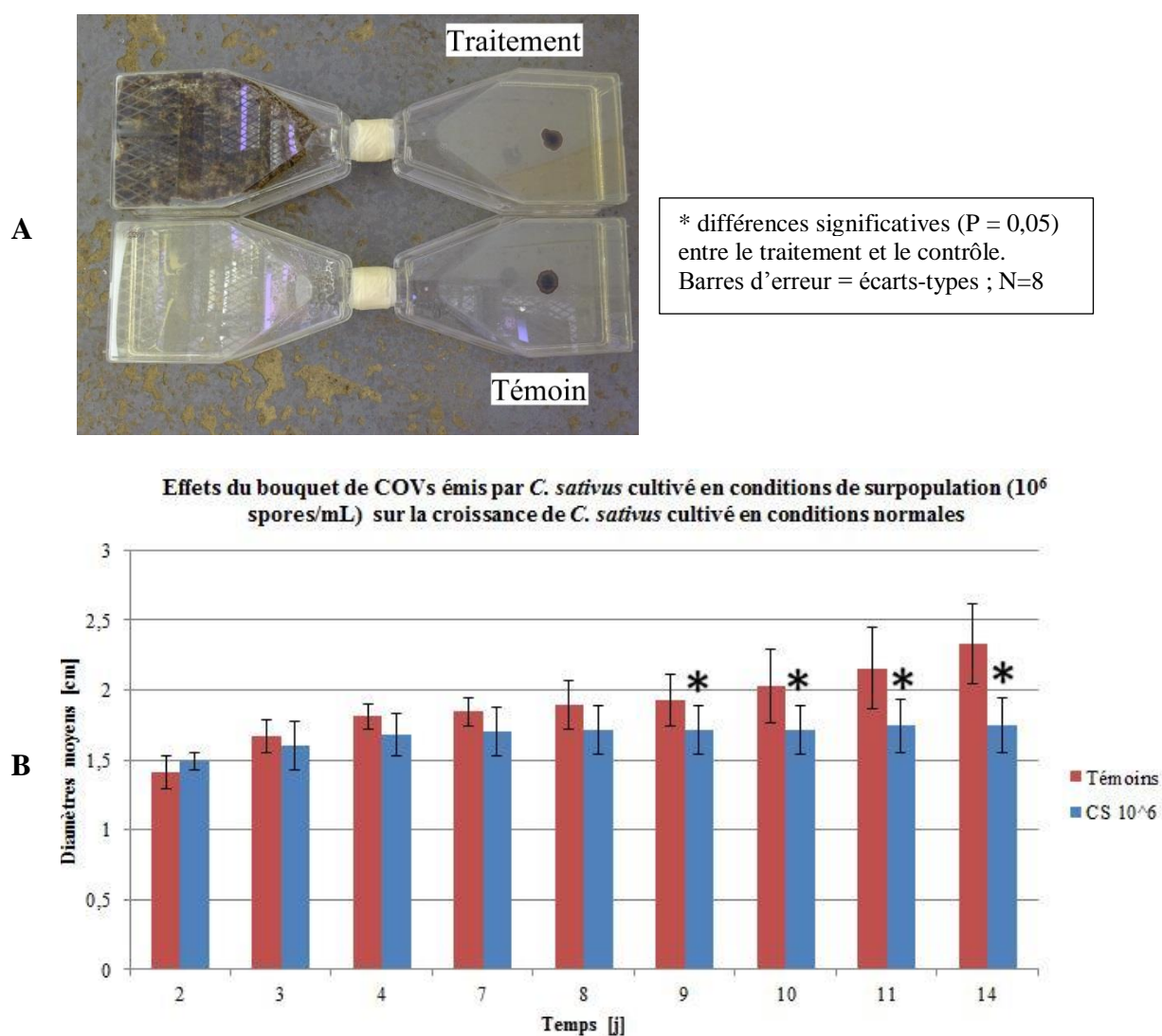


Figure 21 - Effets du bouquet de COVs émis par *C. sativus* (CS) cultivé en conditions de surpopulation sur la croissance de *C. sativus* cultivé en conditions normales. **A.** Photo des effets au 14^{ème} jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *C. sativus* au cours du temps.

4.2.5. Discussion

De manière générale, nous avons observé que les valeurs des écarts-types obtenus pour *C. sativus* étaient plus grandes que celles obtenues pour *F. culmorum*. Cette observation s'explique par la manière dont croissent les champignons. En effet, *F. culmorum* possède une croissance rapide et concentrique tandis que *C. sativus* possède une croissance plus lente et peut grandir sur lui-même ou dans des directions diverses rendant les mesures plus difficiles.

Les bouquets de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* cultivé sur un milieu pauvre n'ont pas d'effet sur leurs croissances respectives. Cela pourrait simplement s'expliquer par le peu de COVs identifiés pour ce traitement dans la section 4.1.

Notons que, dans le cas de l'effet du bouquet de COVs émis par *F. culmorum* cultivé sur un milieu pauvre, nous avons observé une différence significative de croissance par rapport au témoin uniquement au 2^{ème} jour de croissance. Ce résultat peut s'expliquer par le stade de croissance de *F. culmorum* qui est jeune ainsi que par des écarts-types faibles.

Les bouquets de COVs émis par les deux souches en conditions de surpopulation ont un effet significatif de réduction de leur croissance par rapport au témoin. L'effet inhibiteur des COVs sur la croissance du mycélium a déjà été observé dans plusieurs études. Fialho et al. (2011) ont montré que les COVs de *Saccharomyces cerevisiae* inhibent la croissance du mycélium de *Guignardi citricarpa*. Rouissi et al. (2013) ont également montré les effets inhibiteurs des COVs de *Penicillium expansum* sur la croissance du mycélium de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* et *Monilinia laxa*.

Toutefois, dans notre étude, les effets inhibiteurs s'apparentent à de l'auto-inhibition puisque ce sont les COVs de *F. culmorum* qui agissent sur sa propre croissance. Cette observation va dans le sens de l'étude de Breeuwer et al. (1997) qui montrent que la germination des spores de *Rhizopus oligosporus* est ralentie à des concentrations élevées de spores. Cependant, nos résultats montrent un ralentissement de la croissance du mycélium des pathogènes et non de la germination des spores. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les COVs pourraient avoir des effets inhibiteurs sur différents mécanismes de développement. C'est ce qu'ont montré Breeuwer et al. (1997) où les effets inhibiteurs des COVs se produisent à plusieurs stades de germination des spores.

Le mode d'action des volatils anti-fongiques est très peu étudié. Des études suggèrent que les COVs occasionnent des dégâts sur l'ADN (Mitchell et al., 2010), altérant ainsi les enzymes liées à la morphogenèse (Wheatley, 2002). Les COVs pourraient aussi altérer les propriétés

des membranes et déclencher un stress oxydatif (Effmert et al., 2012). Ces hypothèses pourraient expliquer que l'inhibition peut se réaliser tant à la sporulation qu'à la croissance du mycélium.

Les résultats de notre étude pour la culture en conditions de surpopulation pourraient s'expliquer par le phénomène de *quorum sensing* développé à la section 1.2.2 et nous ont poussées à rechercher les composés responsables de ces effets inhibiteurs de croissance. En effet, quelques études semblent montrer qu'il existe des COVs spécifiques responsables de ces effets. Hobot et al. 1980 ont démontré que l'acide nonanoïque était un composé auto-inhibiteur de la croissance des spores de *Syncephalastrum racemosum*. Une étude récente a également montré que la germination des spores de *Penicillium camemberti* dépend de l'effet de population et est régulée par le 1-octanol (Gillot et al., 2016). Une concentration de 3mM du composé provoque une inhibition totale de la germination de *P. camemberti*, et une inhibition partielle intervient dès 100µM.

4.3. Effets individuels des composés organiques volatils

La section 4.2 a montré que les bouquets de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* cultivés en conditions de surpopulation ont eu un effet significatif de réduction sur leur propre croissance.

Huit composés provenant de ces bouquets ont donc été sélectionnés pour être testés individuellement. Les composés choisis (Tableau 8) ont été émis à 7 jours de croissance, font partie des principaux pics retrouvés dans les chromatogrammes et présentent une bonne qualité d'identification. Cette sélection s'est opérée selon le potentiel inhibiteur relevé dans la littérature et la disponibilité du composé au laboratoire au moment de l'étude.

Tableau 8 – Liste des composés testés individuellement sur la croissance de *F. culmorum* et *C. sativus*.

COVs testés pour le bouquet de <i>F. culmorum</i> en conditions de surpopulation à 7 jours de croissance.	COVs testés pour le bouquet de <i>C. sativus</i> en conditions de surpopulation à 7 jours de croissance.
Acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle
Acétate d'isoamyle	Alcool isoamylique
Alcool isoamylique	Isobutanol
Isobutanol	Longifolène
1-pentanol	(+)-sativène
Toluène	

4.3.1. Effets des COVs sur *F. culmorum*

Acétate d'éthyle

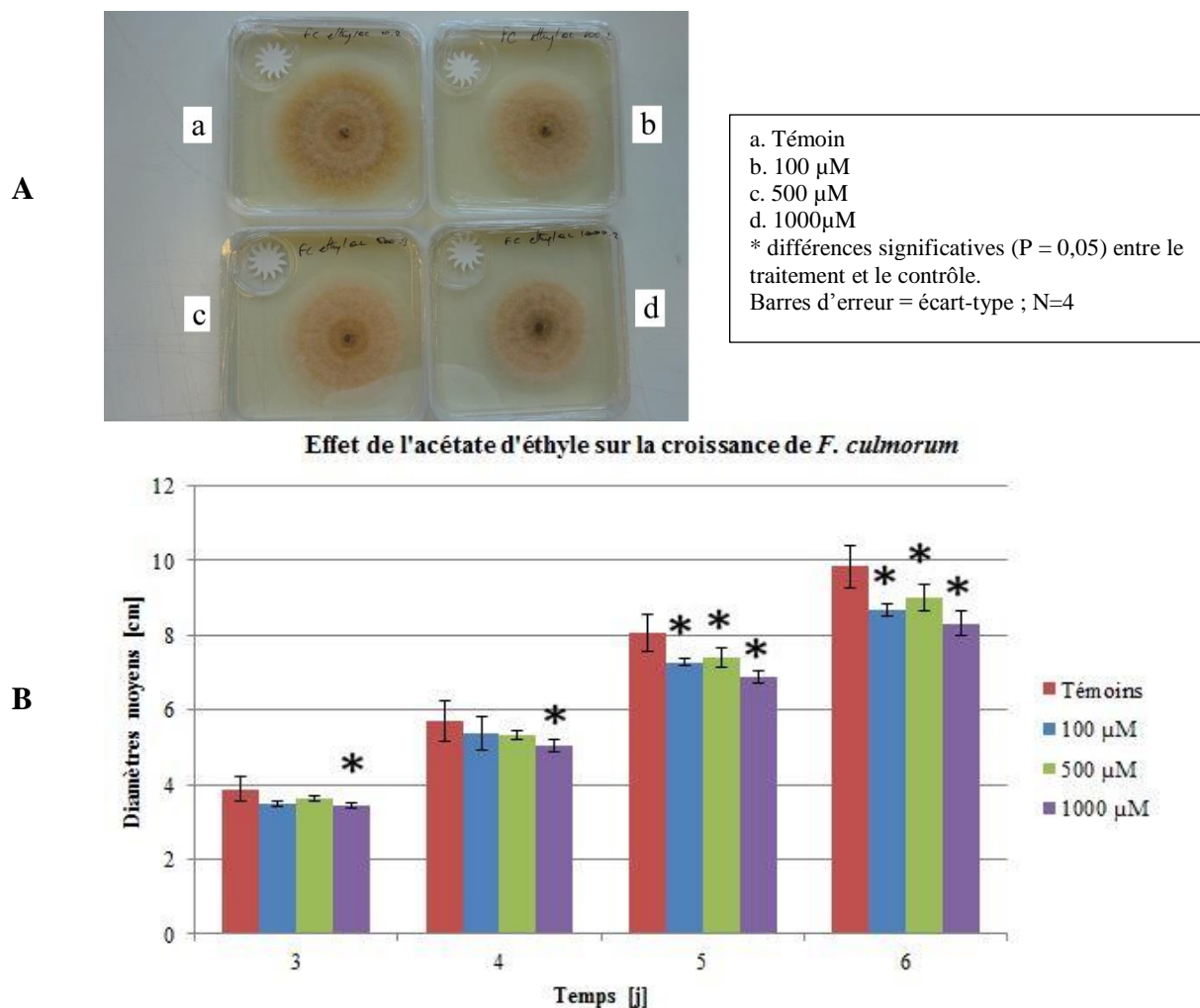


Figure 22 - Effets de l'acétate d'éthyle sur la croissance de *F. culmorum*. **A.** Photo des effets au 6^{ème} jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *F. culmorum* au cours du temps.

Les effets de l'acétate d'éthyle sur la croissance de *F. culmorum* au bout de 7 jours de croissance sont illustrés dans les figures 22.A et 22.B.

La photo met en évidence une différence de pigmentation visible entre le témoin et les trois concentrations ainsi qu'une différence de taille plus marquée pour la concentration de 100 μ M.

L'analyse statistique montre d'ailleurs une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour la concentration de 1000 μ M dès le 3^{ème} jour, et pour les concentrations de 100 et 500 μ M au 5^{ème} jour.

Acétate d'isoamyle

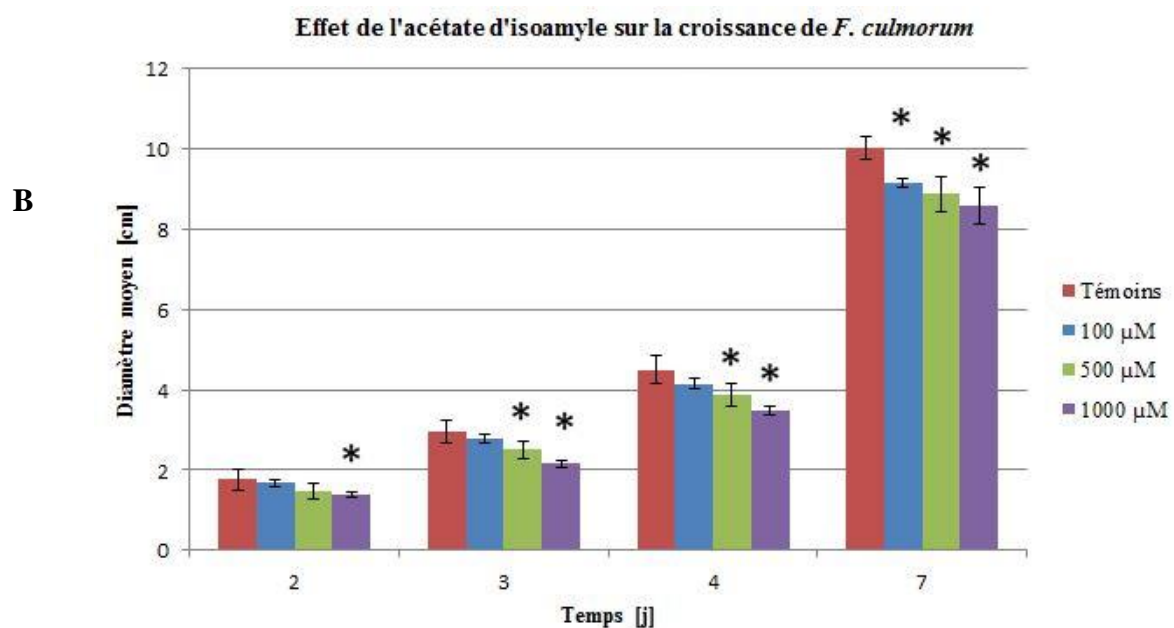
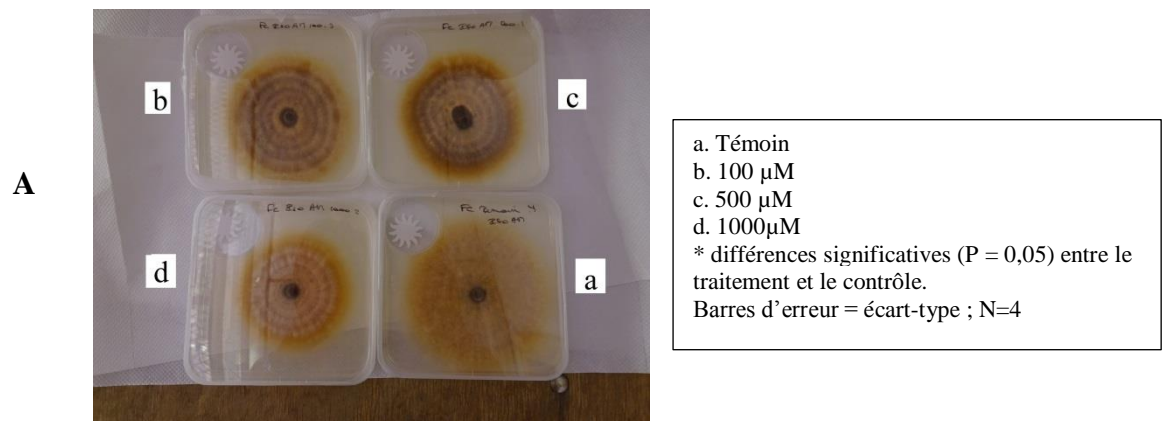


Figure 23 - Effets de l'acétate d'isoamyle sur la croissance de *F. culmorum*. **A.** Photo des effets au 7ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *F. culmorum* au cours du temps.

Les effets de l'acétate d'isoamyle sur la croissance de *F. culmorum* au bout de 7 jours de croissance sont illustrés dans les figures 23.A et 23.B.

Sur la photo, nous observons une différence de pigmentation entre le témoin et les trois concentrations ainsi qu'une différence de taille.

L'analyse statistique montre une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour la concentration 1000 μ M dès le 2^{ème} jour, pour la concentration 500 μ M au 3^{ème} jour et par la concentration 100 μ M au dernier jour de croissance. L'effet de réduction de croissance semble donc proportionnel à la concentration appliquée.

Alcool isoamylique

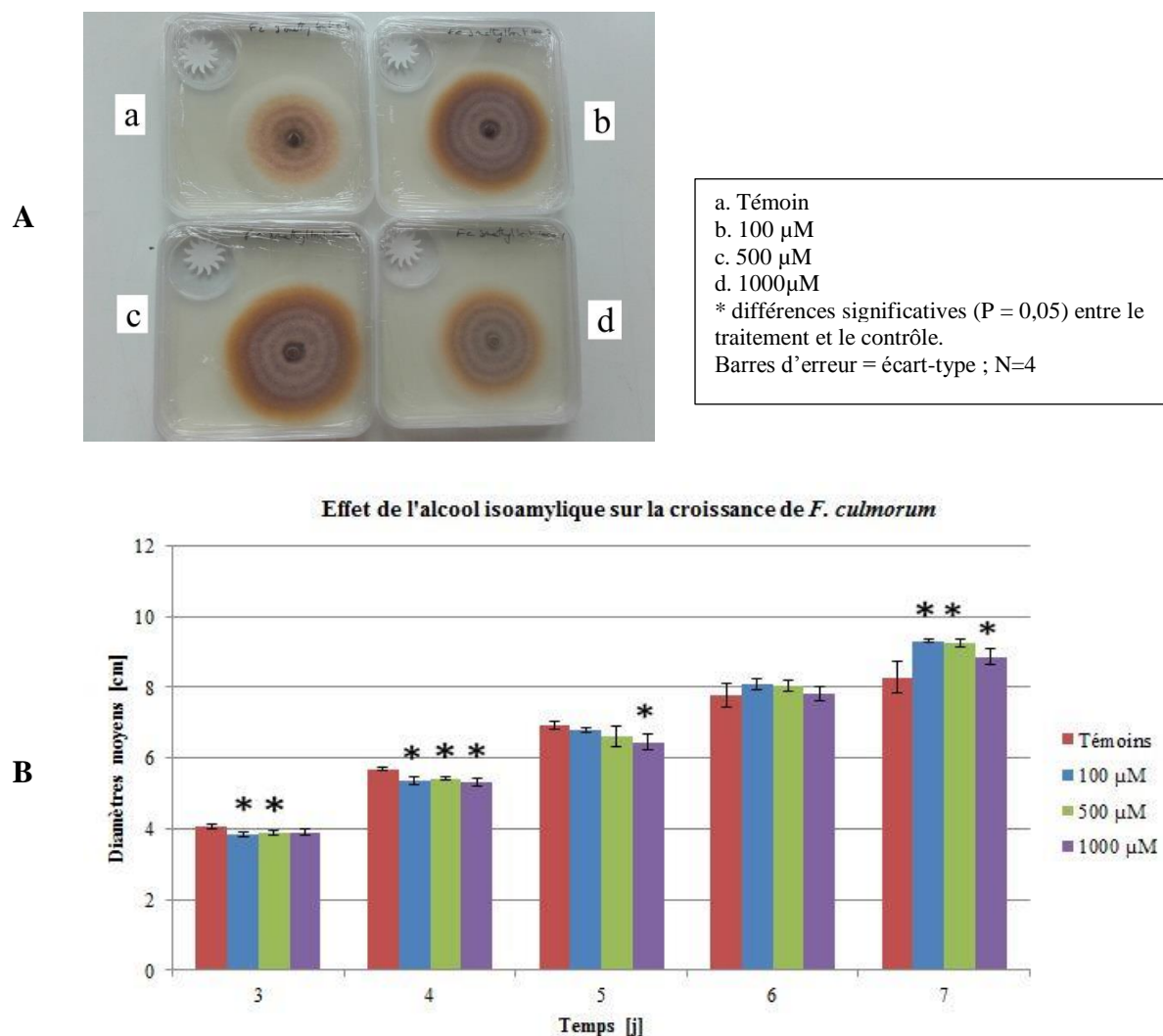


Figure 24 - Effets de l'alcool isoamylique sur la croissance de *F. culmorum*. **A.** Photo des effets au 7ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *F. culmorum* au cours du temps.

Les effets de l'alcool isoamylique sur la croissance de *F. culmorum* au bout de 7 jours de croissance sont illustrés dans les figures 24.A et 24.B.

Une différence de pigmentation est visible entre le témoin et la concentration 1000 µM et les concentrations 100 et 500 µM ainsi qu'une différence de taille.

Une différence statistiquement significative de réduction de croissance par rapport au témoin s'observe pour les concentrations de 100 et 500 µM pour le 3^{ème} et 4^{ème} jour. Cette différence significative est aussi observée pour la concentration de 1000 µM pour le 4^{ème} jour.

Nous pouvons aussi constaté une différence significative d'augmentation de croissance par rapport au témoin pour les 3 concentrations au 7^{ème} jour de croissance.

Une inversion de la tendance de l'effet de l'alcool isoamylique est observée.

Isobutanol

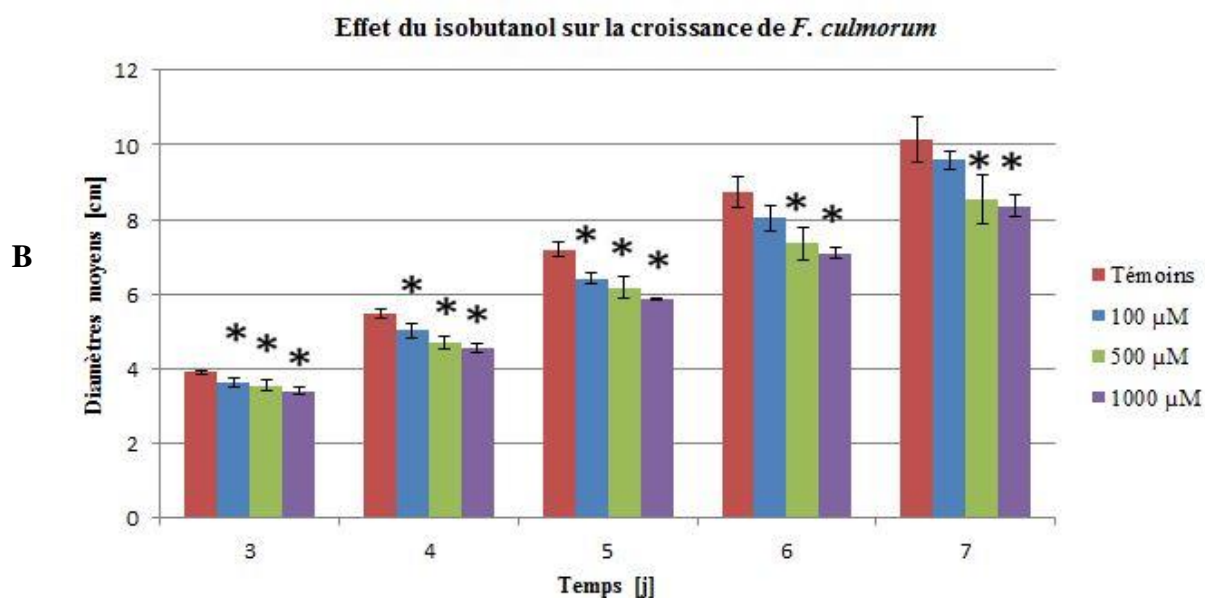
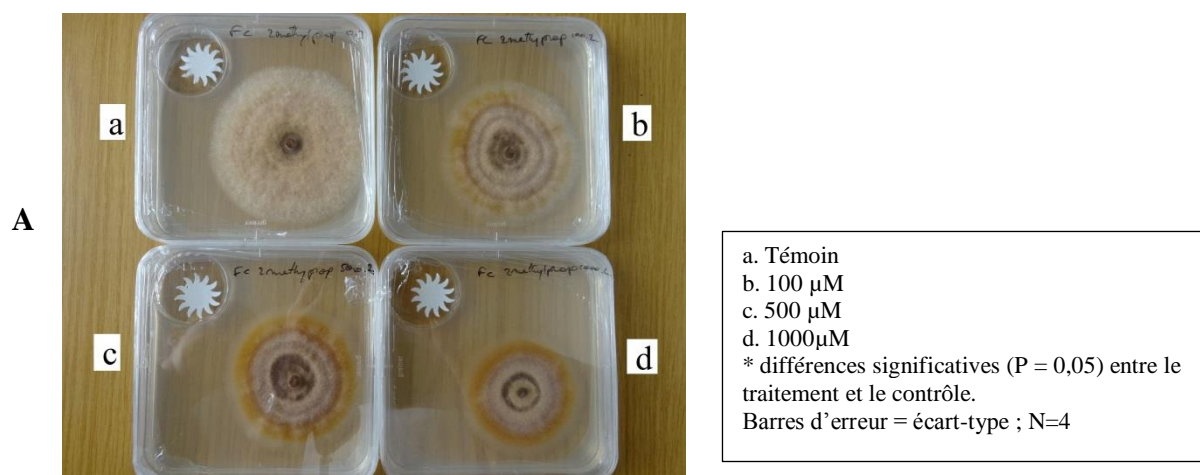


Figure 25 - Effets de l'isobutanol sur la croissance de *F. culmorum*. **A.** Photo des effets au 7^{ème} jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *F. culmorum* au cours du temps.

Les effets de l'isobutanol sur la croissance de *F. culmorum* au bout de 7 jours de croissance sont illustrés dans les figures 25.A et 25.B.

Une différence de pigmentation et de taille sont visibles entre le témoin et les trois concentrations.

L'analyse statistique montre une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour les trois concentrations dès le 3^{ème} jour. Cependant, la différence significative de croissance pour la concentration 100 µM disparaît à partir du 6^{ème} jour de croissance.

Pentan-1-ol

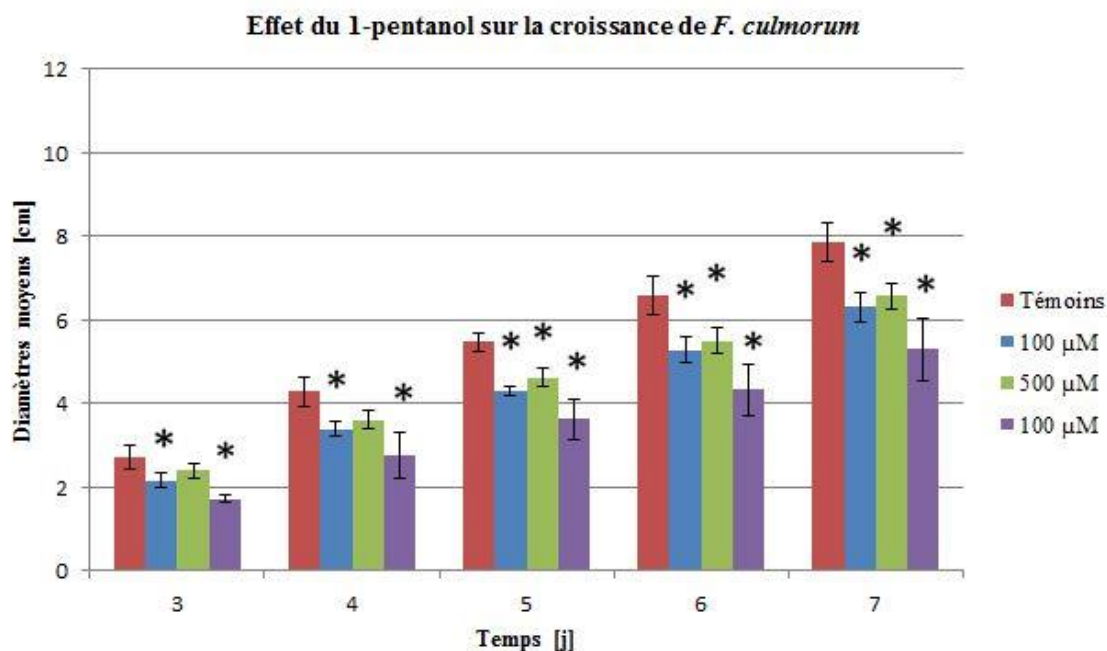


Figure 26- Graphique des croissances de *F. culmorum* sous les effets du 1-pentanol au cours du temps ; * différences significatives ($P=0,05$) entre le traitement et le contrôle ; Barres d'erreur = écarts-types ; $N=4$

Les effets du pentanol sur la croissance de *F. culmorum* au bout de 7 jours de croissance sont illustrés dans la figure 26.

L'analyse statistique montre une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour les concentrations de 100 et 1000 µM dès le 3^{ème} jour de croissance et pour la concentration de 500 µM au 5^{ème} jour.

L'effet de réduction de croissance est plus faible pour la concentration 500 µM que pour les deux autres concentrations.

Toluène

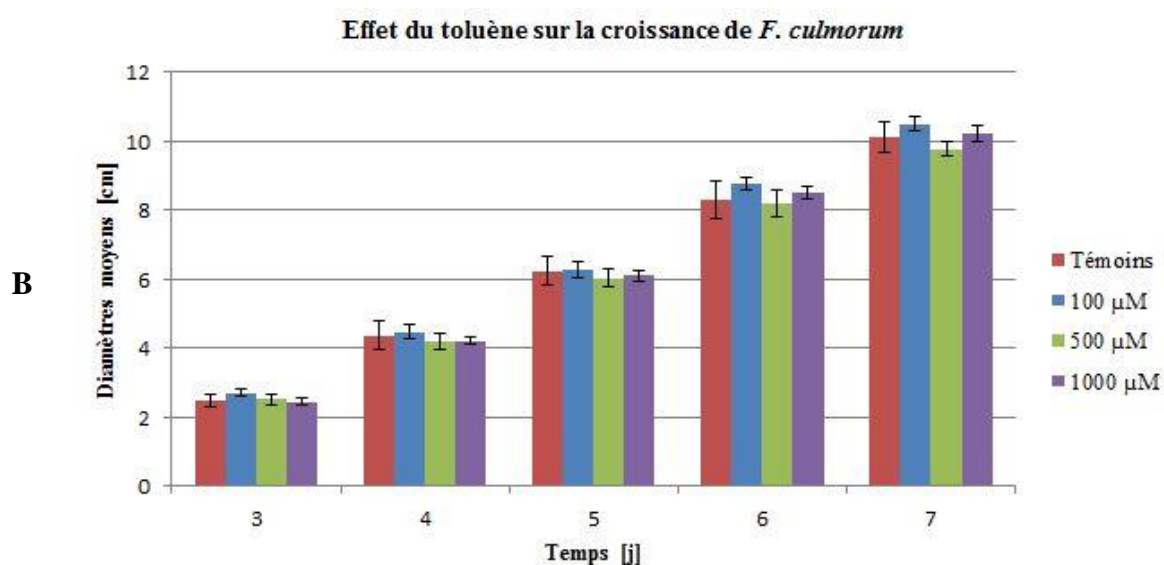
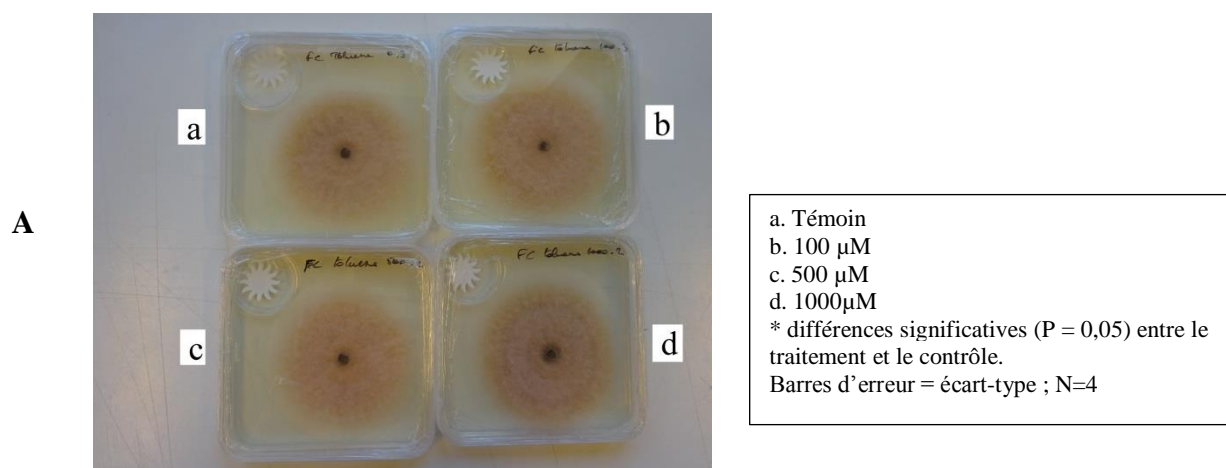


Figure 27 - Effets du toluène sur la croissance de *F. culmorum*. **A.** Photo des effets au 7ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *F. culmorum* au cours du temps.

Les effets du toluène sur la croissance de *F. culmorum* au bout de 7 jours de croissance sont illustrés dans les figures 27.A et 27.B.

Sur la photo, aucune différence de pigmentation ou de taille ne peut être observée et différence significative de réduction de croissance n'est démontrée par rapport au témoin pour les trois concentrations.

4.3.2. Effets des COVs sur *C. sativus*

Acétate d'éthyle

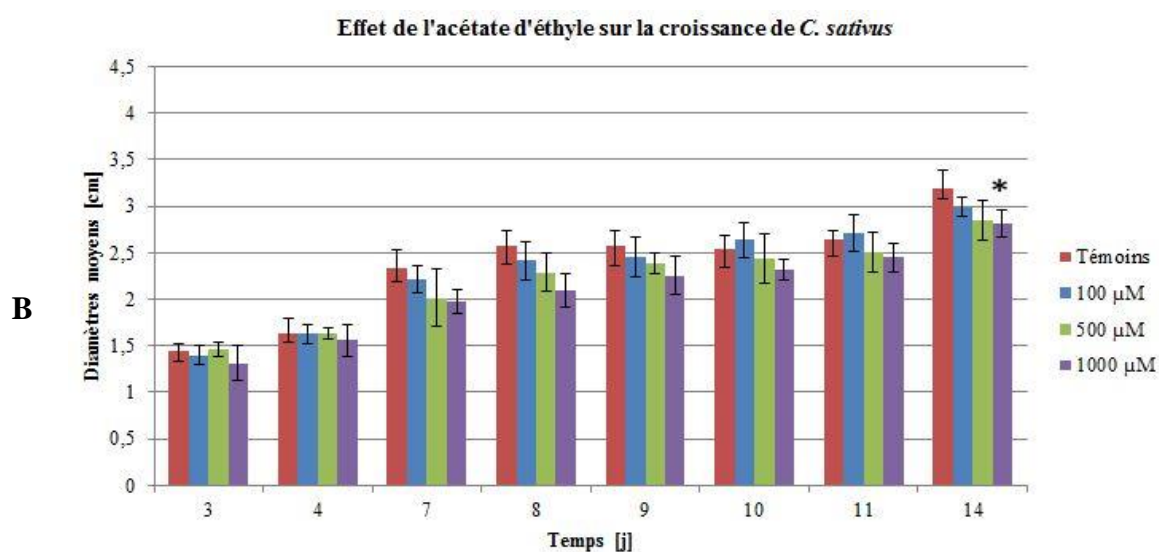
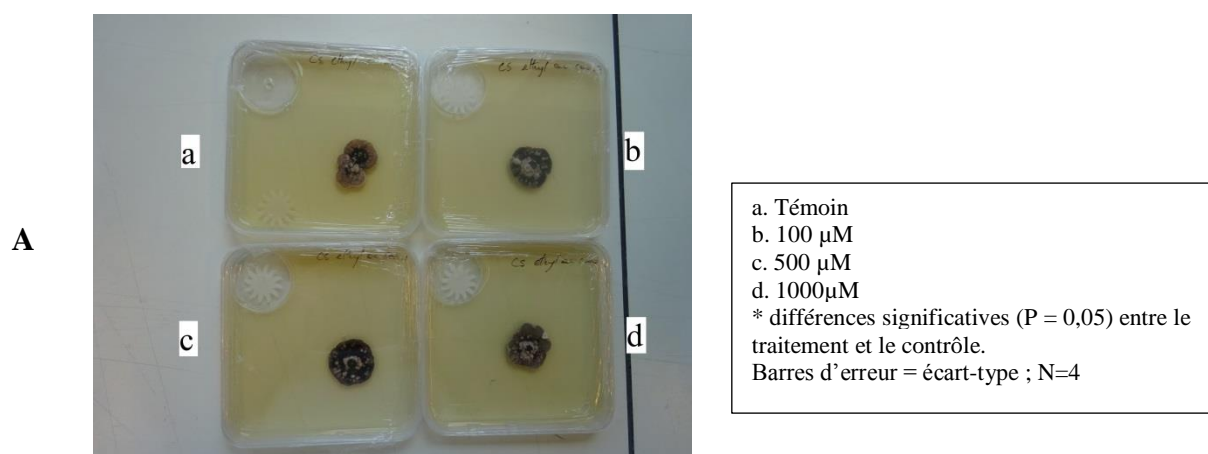


Figure 28 - Effets de l'acétate d'éthyle sur la croissance de *C. sativus*. **A.** Photo des effets au 14ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *C. sativus* au cours du temps.

Les effets de l'acétate d'éthyle sur la croissance de *C. sativus* au bout de 14 jours de croissance sont illustrés dans les figures 28.A et 28.B.

Sur la photo, aucune différence n'est observée.

L'analyse statistique ne montre pas de différence significative de réduction croissance par rapport au témoin pour les 3 concentrations, sauf pour la concentration 1000 µM où une différence significative se manifeste au 14^{ème} jour.

Un ralentissement de croissance en fonction de la concentration est visible pour les jours 7, 8, 9 et 14 de croissance.

Alcool isoamylique

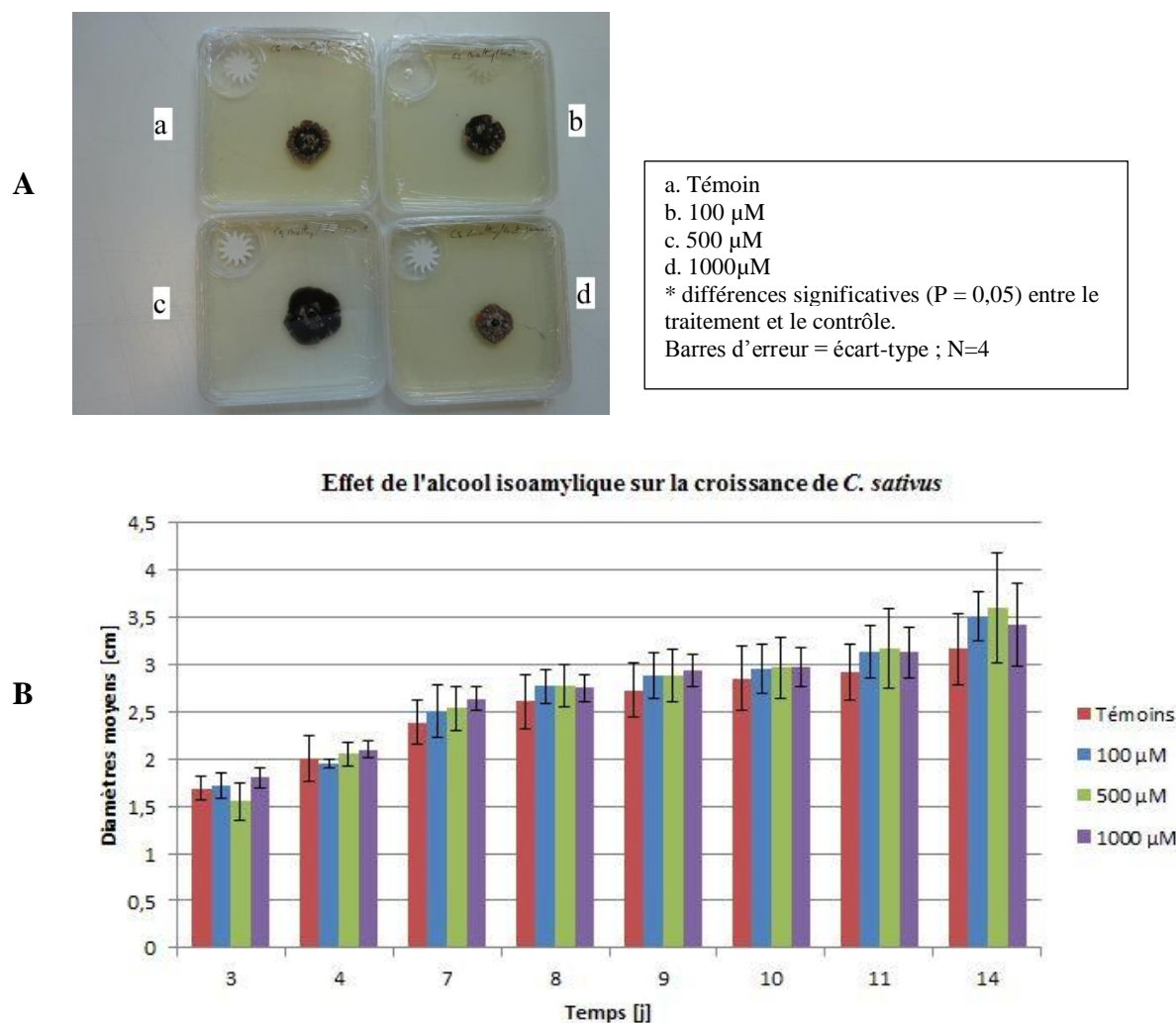


Figure 29 - Effets de l'alcool isoamylique sur la croissance de *C. sativus*. **A.** Photo des effets au 14ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *C. sativus* au cours du temps.

Les effets de l'alcool isoamylique sur la croissance de *C. sativus* au bout de 14 jours de croissance sont illustrés dans les figures 29.A et 29.B.

Sur la photo, aucune différence n'est observée.

L'analyse statistique ne montre pas de différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour les 3 concentrations. Cependant, le graphique montre une tendance à une augmentation de la croissance du champignon par rapport au témoin et ce dès les premiers jours. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus sur la croissance de *F. culmorum* avec le même composé.

Isobutanol

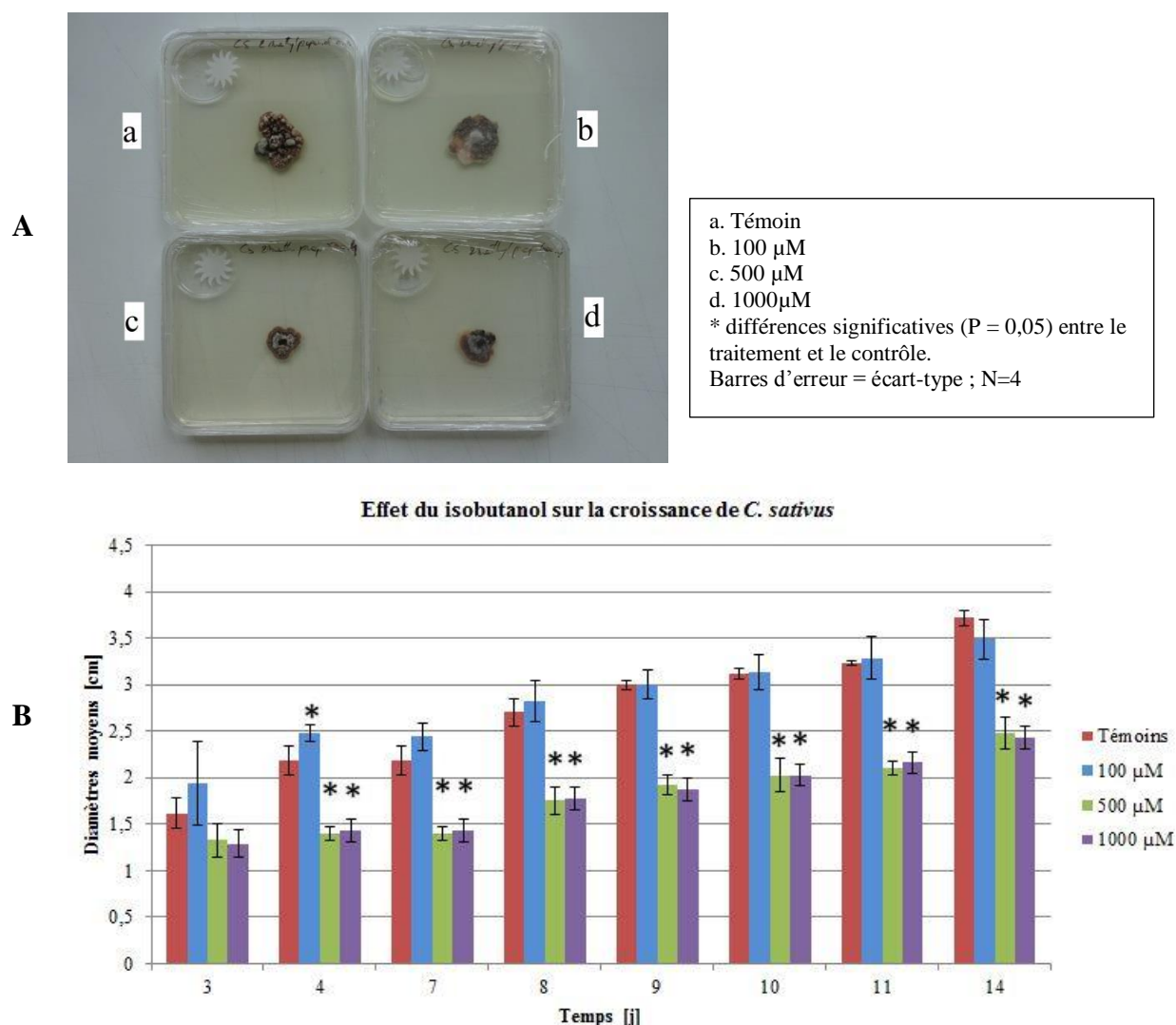


Figure 30 - Effets de l'isobutanol sur la croissance de *C. sativus*. **A.** Photo des effets au 14^{ème} jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *C. sativus* au cours du temps.

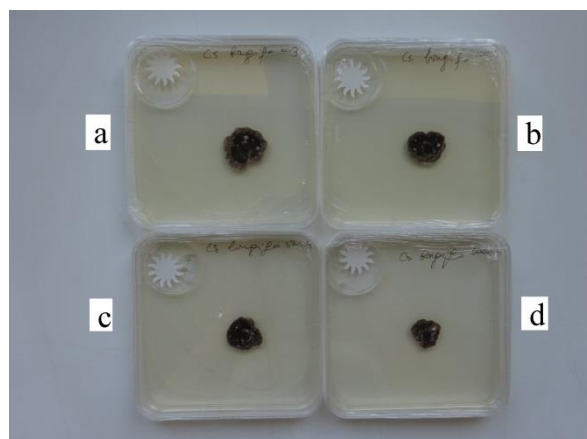
Les effets de l'isobutanol sur la croissance de *C. sativus* au bout de 14 jours de croissance sont illustrés dans les figures 30.A et 30.B.

Sur la photo, une différence de taille est observée entre le témoin et les concentrations de 500 et 1000 µM.

L'analyse statistique confirme une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour les concentrations de 500 et 1000 µM dès le 4^{ème} jour de croissance. Une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin se marque uniquement au 4^{ème} jour pour la concentration de 100 µM.

Longifolène

A



a. Témoin
b. 100 μM
c. 500 μM
d. 1000 μM
* différences significatives ($P = 0,05$) entre le traitement et le contrôle.
Barres d'erreur = écart-type ; $N=4$

Effet du longifolène sur la croissance de *Cochliobolus sativus*

B

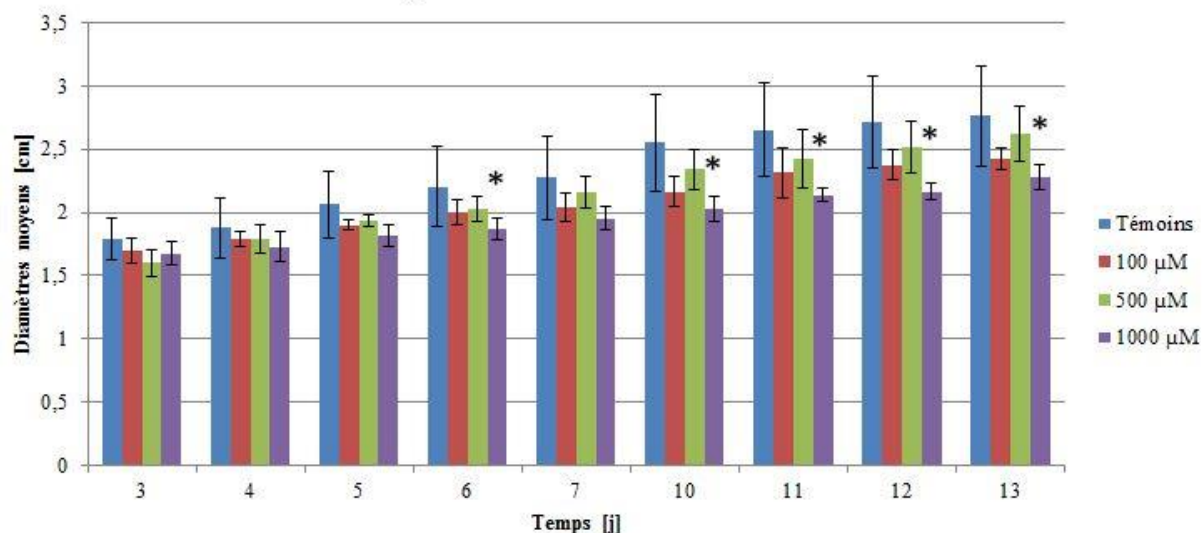


Figure 31 - Effets du longifolène sur la croissance de *C. sativus*. **A.** Photo des effets au 13ème jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *C. sativus* au cours du temps.

Les effets du longifolène sur la croissance de *C. sativus* au bout de 13 jours de croissance sont illustrés dans les figures 31.A et 31.B.

La photo ne montre aucune différence visible.

L'analyse statistique montre une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour la concentration de 1000 μM au 6^{ème} jour de croissance, au 10^{ème} jour et jusqu'à la fin de l'expérience. Le graphique met en évidence une tendance à la réduction de croissance pour les concentrations 100 et 500 μM . Une réduction moins forte pour la concentration de 500 μM par rapport à celles engendrées pour les concentrations de 100 et 1000 μM est observée.

(+)-Sativène

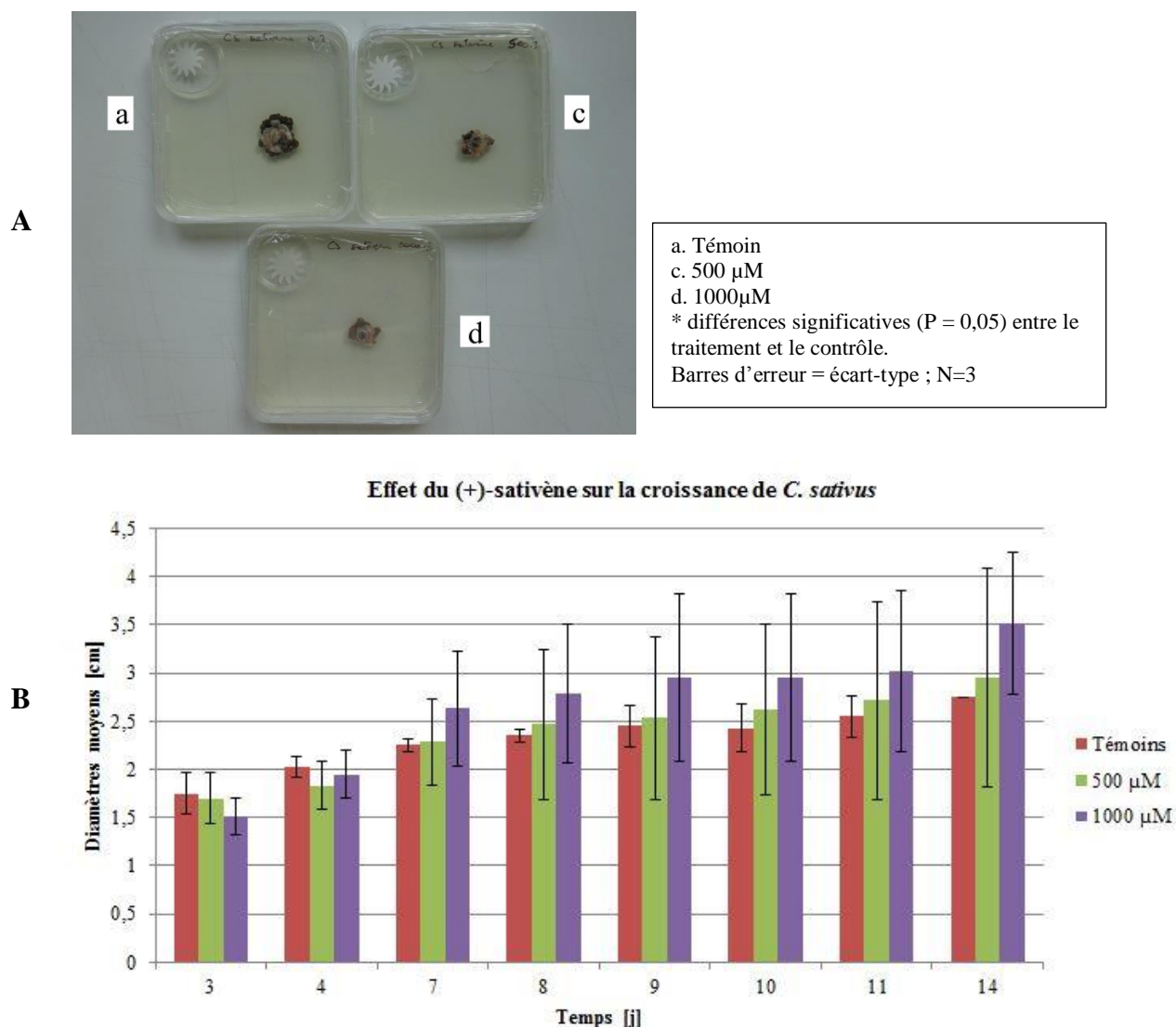


Figure 32 - Effets du (+)-sativène sur la croissance de *C. sativus*. **A.** Photo des effets au 14^{ème} jour de croissance. **B.** Graphique des croissances de *C. sativus* au cours du temps.

Les effets du (+)-sativène sur la croissance de *C. sativus* au bout de 14 jours de croissance sont illustrés dans les figures 32.A et 32.B.

Ni la photo, ni les statistiques ne montrent de différence de réduction de croissance par rapport au témoin pour les deux concentrations. Cependant, le graphique de croissance montre une tendance du (+)-sativène à augmenter la croissance du champignon en fonction de la concentration appliquée.

Synthèse des effets individuels des composés

Le tableau 9 reprend une synthèse des résultats obtenus pour les différents COVs testés individuellement pour chacune des deux souches étudiées.

Tableau 9 - Synthèse des effets individuels des COVs sur la croissance de *F. culmorum* et *C. sativus*.

Composés testés	Effets sur <i>F. culmorum</i>	Effets sur <i>C. sativus</i>
Acétate d'éthyle	Réduction de croissance (100 – 500 – 1000 µM)	Tendance à la réduction de croissance (100 – 500 – 1000 µM)
Acétate d'isoamyle	Réduction de croissance (100 – 500 – 1000 µM)	non testé
Alcool isoamylique	Tendance à l'augmentation de croissance (100 – 500 – 1000 µM)	Tendance à l'augmentation de croissance (100 – 500 – 1000 µM)
Isobutanol	Réduction de croissance (500 – 1000 µM)	Réduction de croissance (500 – 1000 µM)
Longifolène	non testé	Réduction de croissance (1000 µM)
1-pentanol	Réduction de la croissance (100 – 500 – 1000 µM)	non testé
(+)-sativène	non testé	Tendance à l'augmentation de croissance (500 – 1000 µM)
Toluène	Aucune tendance	non testé

4.3.3 Discussion

De manière globale, les mêmes remarques qu'aux points 4.2.3 s'appliquent concernant la difficulté de mesure engendrant des écarts-types plus importants pour *C. sativus* et la présence de différences significatives uniquement en début de croissance.

À cela, s'ajoutent des variations liées à la concentration réelle présente dans les boîtes de Pétri. En effet, les composés étant très volatils, les concentrations pourraient varier légèrement en fonction de la vitesse de fermeture de la boîte de Pétri, même si le manipulateur a tenté d'être le plus constant possible dans ses gestes.

Ce phénomène pourrait expliquer les différences significatives ponctuelles observées sur *F. culmorum* pour l'acétate d'éthyle, l'alcool isoamylique, l'isobutanol et le 1-pentanol; et sur *C. sativus* pour l'isobutanol.

Composés ayant des effets sur F. culmorum et C. sativus

L'acétate d'éthyle provoque une différence significative de réduction de croissance sur *F. culmorum* par rapport au témoin pour les trois concentrations testées. Concernant *C. sativus*, malgré l'absence de différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin, l'éthyle acétate présente une tendance à une réduction de croissance en fonction des concentrations. Cette tendance pousse à conclure que le composé a le même effet sur les deux souches et l'absence de différence significative chez *C. sativus* pourrait s'expliquer par les valeurs élevées des écarts-types. Les résultats obtenus appuient les observations de plusieurs études. L'étude de Masfria (2015) a montré des effets inhibiteurs de croissance sur des bactéries de l'éthyle acétate testés pour les concentrations de 200 - 300 - 500 mg/mL. Kumar et al. (2002), quant à eux, ont prouvé que l'acétate d'éthyle provoque une inhibition de croissance de 75,68% de *Sclerotinia sclerotiorum* au 4^{ème} jour pour une concentration de 500 µg/mL.

L'alcool isoamylique provoque une augmentation significative de croissance par rapport au témoin pour les trois concentrations testées sur *F. culmorum* en fin d'expérience. Malgré l'absence de différence significative chez *C. sativus*, l'alcool isoamylique semble tendre à augmenter la croissance pour les trois concentrations. Dans la littérature, l'alcool isoamylique est déterminé comme un composé responsable de l'inhibition de la germination des spores d'*Aspergillus brasiliensis* exposé à 20 µL du composé et de la suppression complète du développement de *Guignardia citricarpa* (Ando et al., 2012; Pimenta et al., 2017). L'alcool isoamylique a aussi montré des effets inhibiteurs de croissance sur 5 levures et 10 bactéries à 20 µL/boîte de Pétri (Ando et al., 2015). Les effets opposés obtenus dans notre étude pourraient s'expliquer par le fait que certains composés peuvent avoir des effets distincts sur la croissance d'un pathogène en fonction de leur concentration. C'est ce qui a été observé dans l'étude de Splivallo et al., (2007) qui montre que le 1-hexanol à de faibles concentrations favorise la croissance de *Arabidopsis thaliana*, tandis qu'à de hautes concentrations, il possède des effets inhibiteurs sur cette même plante.

L'isobutanol provoque une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour les concentrations de 500 et 1000 µM pour les deux souches étudiées. Très peu d'études ciblent le potentiel antimicrobien de l'isobutanol dans la littérature. Cependant, en 2014, Chauhan et al. ont étudié l'effet de plusieurs alcools sur la croissance des filaments de *Candida albicans*. Ils ont montré que l'isobutanol à 2% réduisait de 15-20% la croissance de *C. albicans* et que l'isobutanol à 4% était toxique pour les cellules de *C. albicans*. Notre étude corrobore les effets de l'isobutanol observés sur *F. culmorum* et *C. sativus*.

Composés ayant des effets sur F. culmorum

L'acétate d'isoamyle provoque une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour les trois concentrations testées sur *F. culmorum*. Ces résultats coïncident avec la littérature. En effet, l'acétate d'isoamyle est identifié comme un composé responsable de l'inhibition des spores d'*Aspergillus brasiliensis* et induit la réduction des galles sur les racines des plants de tomates causées par *Meloidogyne incognita* (Ando et al., 2012; Tian et al., 2014). L'acétate d'isoamyle a aussi un effet d'inhibition de croissance sur 5 levures et 10 bactéries à 160 µL/boîte de Pétri (Ando et al., 2015)

Le 1-pentanol provoque une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour les concentrations de 500 et 1000 µM sur *F. culmorum*. Ces résultats rejoignent les observations faites par plusieurs études. Zunino et al. (2015) montrent des activités antifongiques du composé 1-pentanol, à une concentration beaucoup plus grande que notre étude de 4.24 mM, sur la croissance de *Fusarium verticillioides*. Quant à l'étude de Micalizzi et al. (2017), elle montre que le 1-pentanol inhibe la croissance de *Pseudogymnoascus destructans* à une concentration diluée 10 fois (la concentration initiale n'est pas donnée). Le 1-pentanol a aussi montré une inhibition complète de la filamentation de *Candida albicans* à une concentration de 0,5 % (v/v) (Chauhan et al., 2014).

Le toluène ne produit aucune différence sur la croissance de *F. culmorum*. Les effets potentiels du toluène sur la croissance des microorganismes sont peu décrits dans la littérature. Ce composé est surtout étudié dans des applications de biodégradation du toluène par des biofiltre (Cheng et al., 2016; Esquivel-Gonzalez et al., 2017; Jiménez et al., 2017).

Composés ayant des effets sur C. sativus

Le longifolène provoque une différence significative de réduction de croissance par rapport au témoin pour la concentration de 1000 µM sur *C. sativus*. Dans la littérature, le longifolène se retrouve dans certaines huiles essentielles, notamment extraites de *Pinus thunbergii* ou de *Nigella sativa* qui possèdent des effets inhibiteurs (de Heluani et al., 2005; Tsuruta et al., 2011). L'étude de Tsuruta et al. (2011) montre que le longifolène inhibe la croissance de *Skeletonema costatum*. L'huile extraite de *N. sativa* montre certaines zones d'inhibition sur *Penicillium citrinum* et une inhibition complète de la croissance de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (de Heluani et al., 2005). Wang et al. (2017) ont montré que le longifolène, extrait de l'huile essentielle de *Pinus massoniana*, est le composé responsable de l'inhibition de l'enzyme lipase.

Les résultats obtenus dans notre travail pourraient expliquer le rôle du longifolène dans les effets inhibiteurs de croissance de certaines huiles essentielles comme celles citées précédemment.

En raison de la disponibilité du produit, le (+)-sativène est le seul composé à être testé uniquement pour les concentrations de 500 et 1000 μM à 3 répétitions.

Le (+)-sativène a montré une tendance à augmenter la croissance de *C. sativus* sans différence significative. Dans la littérature, l'étude de Paul et al. (2013) a montré que le (+)-sativène émis par *Cladosporium cladosporioides* CL-1 augmente la croissance des plants de tabac. Cette observation pourrait laisser espérer un phénomène semblable sur les champignons ou bactéries et expliquer nos résultats.

De manière générale, une différence de pigmentation accompagne les différences significatives de croissance observées sur *F. culmorum*. Cette observation est aussi mentionnée par Bruce et al. (2003) qui montrent une réduction de croissance et de pigmentation chez le champignon bleu (moisissure et coloration bleu du bois) sous l'effet de COVs de bactéries et levures. Un changement de pigmentation pourrait être une conséquence de la modification des fonctions de la vacuole fongique, organite acidifié des champignons, qui contrôle des fonctions cellulaires et qui serait endommagée suite aux effets inhibiteurs (Yang et al., 2013; Tournu et al., 2017)

Les résultats que nous avons obtenus semblent prometteurs mais il faut tenir compte du fait que les concentrations testées sont largement supérieures aux concentrations naturellement émises. Certains résultats positifs pourraient donc être causés par une toxicité du composé à de telles concentrations et non à un réel effet inhibiteur de croissance. La prudence est donc de mise.

CONCLUSIONS

Notre étude montre que les bouquets de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* en conditions de surpopulation inhibent la propre croissance des les deux souches étudiées.

Les composés majoritaires de chaque bouquet de COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* en situation de stress, et notamment en conditions de surpopulation, ont été identifiés et nous ont permis de sélectionner huit composés prometteurs dont l'effet a été testé individuellement : l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle, l'alcool isoamylique, l'isobutanol, le longifolène, le (+-)-sativène et le toluène.

Des différences significatives de réduction de croissance ont été observées pour l'acétate d'éthyle, l'acétate d'isoamyle, l'isobutanol et le 1-pentanol sur *F. culmorum*. Le longigolène et l'isobutanol sont les deux composés à produire des différences significatives de réduction de croissance sur *C. sativus*.

Nos résultats tendent à montrer que ces composés pourraient constituer une alternative durable aux pesticides chimiques et que des études plus approfondies mériteraient d'être réalisées.

Cependant, plusieurs aspects de l'étude doivent être pris en compte avant de conforter les résultats. En effet :

- les tests sont réalisés pour de grandes concentrations de composés,
- les composés sont testés individuellement alors qu'il est possible qu'une synergie se crée entre plusieurs composés,
- l'expérience s'est réalisée *in vitro*.

Ces conditions d'expérimentation pourraient éloigner les résultats obtenus de ceux qui pourraient être attendus en conditions réelles.

En conclusion, nos résultats montrent que de nouveaux composés sont émis lorsque des espèces fongiques sont placées en situation de stress, plus particulièrement en surpopulation. Parmi ces composés plusieurs développent des activités antifongiques ce qui entr'ouvre une porte vers une alternative durable aux pesticides chimiques.

PERSPECTIVES

Amélioration du protocole

Mêmes si les résultats obtenus ici soient prometteurs, il reste à améliorer le protocole sur plusieurs points, notamment

- Au niveau de l'identification des COVs : il conviendrait d'essayer de concentrer les analyses sur la GC-MS sur une durée la plus courte possible afin de réduire les variations liées aux utilisateurs multiples de la machine,
- De la durée de mesures : le nombre de jours de mesure devrait être revu à la hausse pour *F. culmorum* et utiliser des dispositifs plus grands au vu de sa vitesse de croissance élevée.
- Enfin, de manière générale : l'augmentation du nombre de répétitions par traitement améliorerait la robustesse des résultats.

A cela, s'ajoute l'intérêt de tester les composés de notre étude sur d'autres microorganismes ainsi que sur la sporulation afin d'élargir l'étude de leur potentiel inhibiteur.

Aller plus loin

Ce travail avait pour but de caractériser et d'identifier des COVs émis par *F. culmorum* et *C. sativus* dans une optique d'étude de leur potentiel anti microbien. La préférence s'est donc portée vers une étude exploratoire permettant un champ d'étude le plus large possible.

Dans l'avenir, une étude quantitative pourrait étudier les effets individuels des COVs dans des doses naturelles d'émission afin d'approcher le plus possible les conditions réelles.

L'étude quantitative fait souvent appel à une méthode d'analyse dynamique des composés connus sous le nom de « purge and trap ». Cette méthode consiste, à l'aide d'un gaz vecteur, de capturer les volatiles dans une cartouche mais présente des difficultés techniques. La littérature relève d'ailleurs peu d'études sur les COVs fongiques utilisant la méthode dynamique (Larsen et al., 1995; Chen et al., 2014).

Il serait aussi intéressant de tester les composés de notre étude sur d'autres microorganismes ainsi que sur la sporulation afin d'élargir l'étude de leur potentiel inhibiteur.

L'application des COVs microbiens dans des conditions se rapprochant de la réalité reste encore un challenge. En effet, l'une des propriétés principales des COVs est leur volatilité élevée. Leur utilisation sur le terrain peut donc mener à des pertes de composés dans l'environnement. De plus, les mVOCs sont généralement émis en continu et en de très faible

quantité. Ce processus est difficile à mimer même si des dispositifs sont déjà proposés (Heuskin et al., 2012; Roy et al., 2014). Kessler et al. (2001) ont montré que l'application d'une dose unique en grande quantité pouvait induire un stress sur des plantes. L'application de COVs sur des champs de culture se complexifie encore plus par la mise en jeu de nombreuses interactions entre organismes comme d'autres champignons ou bactéries, des virus, des plantes ou encore des insectes. Les volatils appliqués ne vont donc pas seulement interagir avec les organismes ciblés. Les techniques développées devront donc prendre en compte ces interactions. La complexité des effets des COVs sur le métabolisme des organismes fait de cette alternative en lutte biologique un challenge en termes de développement de technologies respectueuses de l'environnement.

Un autre défi pratique consiste en l'utilisation d'un mélange de composés. Les activités biologiques observées sont en effet rarement menées par un unique composé, et la libération d'un mélange de composés possédant différentes volatilités et concentrations pose des problèmes pratiques (Pickett et al., 2016).

Il existe quelques études sur les effets des mVOC *in vivo*. Cependant dans la majorité, les microorganismes sont d'abord cultivés sur un milieu riche avant d'être inoculés dans le sol avec une certaine quantité de milieu. La présence du milieu riche dans le sol représente toujours des conditions artificielles et il est donc difficile d'en connaître l'effet (Berrada et al., 2012; Fernando et al., 2005).

D'autres études ont pourtant réussi à minimiser les biais. Ils ont éliminé le milieu riche en cultivant les pathogènes sur des grains de blé stérilisés à l'autoclave (Cortes-Barco et al., 2010; Li et al., 2012). Des essais de mycofumigation ont également montré de bons espoirs dans la protection des récoltes des pommes et des oranges (Lee et al., 2009; Toffano et al., 2017)

Ces quelques exemples montrent la possibilité du passage *in vitro* vers le *in vivo*, ouvrant ainsi une voie d'exploration future pour des recherches sur les mVOCs comme agents de biocontrôle.

RÉFÉRENCES

- Agilent Technologies, n.d. Guide de diagnostic des pannes en GC.
https://www.agilent.com/cs/library/posters/Public/5988-6191%20GC%20Troubleshooting%20Guide%20poster_FR.pdf
- Albuquerque P. & Casadevall A., 2012. Quorum sensing in fungi – a review. *Med. Mycol.* **50**(4), 337–345.
- Alpha C.J., Campos M., Jacobs-Wagner C. & Strobel S.A., 2015. Mycofumigation by the volatile organic compound-producing Fungus *Muscodor albus* induces bacterial cell death through DNA damage. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**(3), 1147–1156.
- Ando H., Hatanaka K., Ohata I., Yamashita-Kitaguchi Y., Kurata A. & Kishimoto N., 2012. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control* **26**(2), 472–478.
- Ando H., Kurata A. & Kishimoto N., 2015. Antimicrobial properties and mechanism of volatile isoamyl acetate, a main flavour component of Japanese sake (Ginjo-shu. *J. Appl. Microbiol.* **118**(4), 873–880.
- Asari S., Matzén S., Petersen M.A., Bejai S. & Meijer J., 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(6).
- Atmosukarto I., Castillo U., Hess W.M., Sears J. & Strobel G., 2005. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Sci.* **169**, 854–861.
- Aver'Yanov A., Lapikova V., Pasechnik T., Zakharenkova T. & Baker C., 2011. Self-inhibition of spore germination via reactive oxygen in the fungus *Cladosporium cucumerinum*, causal agent of cucurbit scab. *Eur. J. Plant Pathol.* **130**(4), 541–550.
- Azeem M., Rajarao G.K., Terenius O., Nordlander G., Nordenhem H., Nagahama K., Norin E. & Borg-Karlson A.K., 2015. A fungal metabolite masks the host plant odor for the pine weevil (*Hylobius abietis*). *Fungal Ecol.* **13**, 103–111.
- B L., M Z., C K., X P. & G L., 2003. [Chemical composition of volatile oil from *Chromolaena odorata* and its effect on plant, fungi and insect growth]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao J. Appl. Ecol.* **14**(5), 744–746.
- Baghi R., 2013. Emissions biogéniques de composés organiques volatils en région méditerranéenne - développement instrumental, mesures et modélisation.
- Bailly A. & Weisskopf L., 2012. The modulating effect of bacterial volatiles on plant growth current knowledge and future challenges. *Plant Signal. Behav.* **7**(1), 79–85.
- Barik A.J. & Gogate P.R., 2018. Hybrid treatment strategies for 2,4,6-trichlorophenol degradation based on combination of hydrodynamic cavitation and AOPs. *Ultrason. - Sonochemistry* **40**, 383–394.
- Bazemore R.A., Feng J., Cseke L. & Podila G.K., 2012. Biomedically important pathogenic fungi detection with volatile biomarkers. *J. Breath Res.* **6**(1), 016002.
- Berendsen R., Kalkhove S., Lugones L., Baars J., Wösten H. & Bakker P., 2013. Effects of the mushroom-volatile 1-octen-3-ol on dry bubble disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(12), 5535–5543.
- Berrada I., Benkhemmar O., Swings J., Bendaou N. & Amar M., 2012. Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathol. Mediterr.* **51**(3), 625–630.
- Bitas V., Kim H.-S., Bennett J. & Kang S., 2013. Sniffing on Microbes: Diverse Roles of Microbial Volatile Organic Compounds in Plant Health. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **26**(8), 835–843.

- Blackwell A., Dyer C., (Iuntz) A. J., Mordue W., Wadhams L. J. & Mordue W., 1996. The role of 1-octen-3-ol as a host-odour attractant for the biting midge, *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, and interactions of 1-octen-3-ol with a volatile pheromone produced by parous female midges. *Physiol. Entomol.* **21**(1), 15–19.
- Blande J.D., Holopainen J.K. & Li T., 2010. Air pollution impedes plant-to-plant communication by volatiles. *Ecol. Lett.* **13**(9), 1172–81.
- Breeuwer P., De Reu J.C., Drocourt J., Rombouts F.M. & Abee T., 1997. Nonanoic Acid, a Fungal Self-Inhibitor, Prevents Germination of *Rhizopus oligosporus* Sporangiospores by Dissipation of the pH Gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(1), 178–185.
- Bruce A., Stewart D., Verrall S. & Wheatley R.E., 2003. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **51**(2), 101–108.
- Buko M., Kulik T., Ostrowska A., Goral T. & Perkowski J., 2014. Quantitative volatile compound profiles in fungal cultures of three different *Fusarium graminearum* chemotypes. *FEMS Microbiol. Lett.* **359**(1), 85–93.
- Cabral R.S., Suffredini I.B. & Young M.C.M., 2016. Chemical Composition and in vitro Biological Activities of Essential Oils from *Conchocarpus fontanesianus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani (Rutaceae). *Chem. Biodivers.* **13**(10), 1273–1280.
- Casalinuovo I.A., Di Pierro D., Coletta M. & Di Francesco P., 2006. Application of electronic noses for disease diagnosis and food spoilage detection. *Sensors* **6**(11), 1428–1439.
- Cassier P., Bohatier J. & Descoins C., 2000. *Communication chimique et environnement: les relations animales intraspécifiques et interspécifiques.*, Belin sup, Belin, Paris, 256.
- Chambers S.T., Syhre M., Murdoch D.R., McCartin F. & Epton M.J., 2009. Detection of 2-Pentylfuran in the breath of patients with *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 2009 Vol475 P468-476 **47**(5), 468–476.
- Chauhan N.M., Shinde R.B. & Karuppayil S.M., 2014. Effect of alcohols on filamentation, growth, viability and biofilm development in *Candida albicans*. *Braz. J. Microbiol.* **44**(4), 1315–1320.
- Chen G., Zhang R.-R., Liu Y. & Sun W.-B., 2014. Spore Dispersal of Fetid *Lysurus mokusin* by Feces of Mycophagous Insects. *J. Chem. Ecol.* **40**(8), 893–899.
- Cheng Z., Lu L., Kennes C., Yu J. & Chen J., 2016. Treatment of gaseous toluene in three biofilters inoculated with fungi/bacteria: Microbial analysis, performance and starvation response. *J. Hazard. Mater.* **303**, 83–93.
- Cherr G.N., Fairbairn E. & Whitehead A., 2017. Impacts of Petroleum-Derived Pollutants on Fish Development. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **5**, 185–203.
- Chiron N. & Michelot D., 2005. Odeurs des champignons : chimie et rôle dans les interactions biotiques - une revue. *Cryptogam. Mycol.* **26**, 299–364.
- Chitarra G.S., Abee T., Rombouts F.M., Posthumus M.A. & Dijksterhuis J., 2004. Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol, a Volatile Self-Inhibitor. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**(5), 2823–2829.
- Chuang P.-H., Lee C.-W., Chou J.-Y., Murugan M., Shieh B.-J. & Chen H.-M., 2007. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresour. Technol.* **98**(1), 232–236.
- Cortes-Barco A. M., Hsiang T. & Goodwin P. H., 2010. Induced systemic resistance against three foliar diseases of *Agrostis stolonifera* by (2R,3R)-butanediol or an isoparaffin mixture. *Ann. Appl. Biol.* **157**(2), 179–189.
- Crespo R., Pedrini N., Juárez M.P. & Dal Bello G.M., 2008. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiol. Res.* **163**(2), 148–151.
- Darriet P., Pons M., Dumont O., Findeling V., Dubourdieu D., Henry R., Cartolaro P. & Calonnec A., 2002. Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape

- berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* **50**(11), 3277–3282.
- Davis T., Crippen T., Hofstetter R. & Tomberlin J., 2013. Microbial Volatile Emissions as Insect Semiochemicals. *J. Chem. Ecol.* **39**(7), 840–859.
- de Heluani C. & Catalan C., 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J. Sci. Food Agric.* **85**(13), 2297–2306.
- Dicke M. & Loreto F., 2010. Induced plant volatiles: from genes to climate change. *Trends Plant Sci.* **15**(3), 115.
- Directive 1999/13/CE du Conseil du 11 mars 1999 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations. *Journal officiel n° L 085 du 29/03/1999 p. 0001 - 0022*
- Directive 2004/42/CE du Parlement européen et du Conseil du 21 avril 2004 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certains vernis et peintures et dans les produits de retouche de véhicules, et modifiant la directive 1999/13/CE. *Journal officiel n° L 143 du 30/04/2004 p. 0087 - 0096*
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D. & Orlova I., 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* **25**(5), 417–440.
- Effmert U., Kalderás J., Warnke R. & Piechulla B., 2012. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J. Chem. Ecol.* **38**(6), 665–703.
- Esquivel-Gonzalez S., Aizpuru A., Patrón-Soberano A. & Arriaga S., 2017. Characterization of bioaerosol emissions from two biofilters during treatment of toluene vapours using epifluorescence microscopy. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **123**, 78–86.
- Ezquer I., Li J., Ovecka M., Baroja - Fernández E., Muñoz F.J., Montero M., Díaz De Cerio J., Hidalgo M., Sesma M.T., Bahaji A., Etxeberria E. & Pozueta - Romero J., 2010. Microbial Volatile Emissions Promote Accumulation of Exceptionally High Levels of Starch in Leaves in Mono- and Dicotyledonous Plants. *Plant Cell Physiol.* **51**(10), 1674–1693.
- Ezra D. & Strobel G.A., 2003. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Sci.* **165**(6), 1229–1238.
- FAOSTAT, August-13-2017. . <http://www.fao.org/faostat/fr/#country/255>, (13/08/2017).
- Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A.S. & Savchuk S.C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* **37**(5), 955–964.
- Fialho M.B., Ferreira L.F.R., Monteiro R.T.R. & Pascholati S.F., 2011. Antimicrobial volatile organic compounds affect morphogenesis-related enzymes in *Guignardia citricarpa*, causal agent of citrus black spot. *Biocontrol Sci. Technol.* **21**(7), 797–807.
- Fiers M., Lognay G., Fauconnier M.-L. & Jijakli H., 2013. Volatile Compound-Mediated Interactions between Barley and Pathogenic Fungi in the Soil. *PLoS ONE* **8**(6).
- French F.E. & Kline D.L., 1989. 1-Octen-3-ol, an Effective Attractant for Tabanidae (Diptera). *J. Med. Entomol.* **26**(5), 459–461.
- George J., Jenkins N., Blanford S., Thomas M. & Baker T., 2013. Malaria Mosquitoes Attracted by Fatal Fungus. e62632. *PLoS ONE* **8**(5).
- Gillot G., Decourcelle N., Dauer G., Barbier G., Coton E., Delmail D. & Mounier J., 2016. 1-Octanol, a self-inhibitor of spore germination in *Penicillium camemberti*. *Food Microbiol.* **57**, 1–7.
- Goates B.J. & Mercier J., 2009. Effect of biofumigation with volatiles from *Muscodor albus* on the viability of *Tilletia* spp. teliospores. *Can. J. Microbiol.* **55**(2), 203–206.

- Gu Q., Wu H., Raza W., Safdar A., Huang Z. & Gao X., 2017. Effect of volatile compounds produced by *Ralstonia solanacearum* on plant growth promoting and systemic resistance inducing potential of *Bacillus* volatiles. *BMC Plant Biol.* **17**.
- Gupta A.K., Akhtar T.A., Widmer A., Pichersky E. & Schiestl F.P., 2012. Identification of white campion (*Silene latifolia*) guaiacol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of veratrole, a key volatile for pollinator attraction. *BMC Plant Biol.* **12**, <xocs:firstpage xmlns:xocs=>.
- Gutiérrez-Luna F., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Valencia-Cantero E., Cruz H. & Macías-Rodríguez L., 2010. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis* **51**(1), 75–83.
- Heddergott C., Calvo A.M. & Latgé J.P., 2014. The volatome of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell* **13**(8), 1014–1025.
- Herrero-García E., Garzia A., Cordobés S., Espeso E.A. & Ugalde U., 2011. 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol.* **115**(4), 393–400.
- Herrmann A., 2011. *The Chemistry and Biology of Volatiles*, John Wiley & Sons, 534.
- Heuskin S., Lorge S., Godin B., Leroy P., Frère I., Verheggen F.J., Haubruge E., Wathelet J.-P., Mestdagh M., Hance T. & Lognay G., 2012. Optimisation of a semiochemical slow-release alginate formulation attractive towards *Aphidius ervi* Haliday parasitoids. *Pest Manag. Sci.* **68**(1), 127–136.
- Hobot J. & Gull K., 1980. The identification of a self-inhibitor from *Syncephalastrum racemosum* and its effect upon sporangiospore germination. *Antonie Van Leeuwenhoek* **46**(5), 435–441.
- Holopainen J.K. & Blande J.D., 2012. Molecular plant volatile communication. *Adv. Exp. Med. Biol.* **739**, 17–31.
- Holopainen J.K. & Gershenzon J., 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci.* **15**(3), 176–184.
- Hung R., Lee S. & Bennett J., 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**(8), 3395–3405.
- Hung R., Lee S. & Bennett J.W., 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecol.* **6**(1), 19–26.
- Hussain A., Tian M.-Y., He Y.-R. & Lei Y.-Y., 2010. Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi. *J. Invertebr. Pathol.* **104**(3), 166–171.
- Hutchings M.L., Alpha-Cobb C.J., Hiller D.A., Berro J. & Strobel S.A., 2017. Mycofumigation through production of the volatile DNA-methylating agent N-methyl-N-nitrosoisobutyramide by fungi in the genus *Muscodor*. *J. Biol. Chem.* **292**(18), 7358–7371.
- Idris M., Abbas R.Z., Masood S., Rehman T., Farooq U., Babar W., Hussain R., Raza A. & Riaz U., 2017. The potential of antioxidant rich essential oils against avian coccidiosis. *Worlds Poult. Sci. J.* **73**(1), 89–104.
- Ioshida M.D.M., Young M.C.M. & Lago J.H.G., 2010. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from Brazilian Propolis. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **13**(5), 633–637.
- Jelen H., 2003. Use of solid phase micro-extraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *J. Appl. Microbiol.* **36**(5), 263–267.
- Jeleń H. & Wasowicz E., 1998. Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Rev. Int.* **14**(4), 391–426.

- Jeong Ho Lee, Hye Young Yang, Hong Sub Lee & Soon Kwang Hong, 2008. (Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Cones of *Pinus Koraiensis*). *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**(3), 497.
- Jiménez L., Arriaga S., Muñoz R. & Aizpuru A., 2017. Effect of extended and daily short-term starvation/shut-down events on the performance of a biofilter treating toluene vapors. *J. Environ. Manage.* **203**, 68–75.
- Jorge Barriuso, 2015. Quorum sensing mechanisms in fungi. *AIMS Microbiol.* **1**(1), 37–47.
- Kaddes A., Massart S., Fauconnier M.-L. & Jijakli H., 2015. Effect of Volatile Organic Compounds against fungal and bacterial plant pathogens.
- Kaddes A., Massart S., Fauconnier M.-L., Jijakli H. & De Clerck C., 2016. Volatile Organic Compounds: a new tool to control barley pathogens?
- Kai M., Haustein M., Molina F., Petri A., Scholz B. & Piechulla B., 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**(6), 1001–1012.
- Kanchiswamy C.N., Malnoy M. & Maffei M.E., 2015a. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends Plant Sci.* **20**(4), 206–211.
- Kanchiswamy C.N., Malnoy M. & Maffei M.E., 2015b. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* **6**.
- Karov I., Mitrev S. & Kostadinovska E., 2009. *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph *Cochliobolus Sativus*): Causer of barley leaf lesions and root rot in Macedonia. *Zb. Matice Srp. Za Prir. Nauke* 167–174.
- Kennes C. & Veiga M.C., 2004. Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *J. Biotechnol.* **113**(1), 305–319.
- Keshri G., Voysey P. & Magan N., 2002. Early detection of spoilage moulds in bread using volatile production patterns and quantitative enzyme assays. *J. Appl. Microbiol.* **92**(1), 165–172.
- Kessler A. & Baldwin I.T., 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**(5511), 2141–2144.
- Kline D.L., Wood J.R. & Cornell J.A., 1991. Interactive Effects of 1-Octen-3-ol and Carbon Dioxide on Mosquito (Diptera: Culicidae) Surveillance and Control. *J. Med. Entomol.* **28**(2), 254–258.
- Korkmaz A., Hayaloglu A.A. & Atasoy A.F., 2017. Evaluation of the volatile compounds of fresh ripened *Capsicum annuum* and its spice pepper (dried red pepper flakes and isot). *LWT - Food Sci. Technol.* **84**, 842–850.
- Korpi A., Jarnberg J. & Pasanen A.-L., 2009. Microbial Volatile Organic Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **39**(2), 139–193.
- Kováts E., 1958. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta* **41**(7), 1915–1932.
- Koziel J.A., Nguyen L.T., Glanville T.D., Ahn H., Frana T.S. & (Hans) van Leeuwen J., 2017. Method for sampling and analysis of volatile biomarkers in process gas from aerobic digestion of poultry carcasses using time-weighted average SPME and GC–MS. *Food Chem.* **232**, 799–807.
- Kreuzwieser J., Scheerer U., Kruse J., Burzlaff T., Honsel A., Alfarraj S., Georgiev P., Schnitzler J.-P., Ghirardo A., Kreuzer I., Hedrich R. & Rennenberg H., 2014. The Venus flytrap attracts insects by the release of volatile organic compounds. *J. Exp. Bot.* **65**(2), 755–66.
- Kumar J., Schäfer P., Hückelhoven R., Langen G., Baltruschat H., Stein E., Nagarajan S. & Kogel K.-H., 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control†. *Mol. Plant Pathol.* **3**(4), 185–195.

- Kuske M., Romain A.-C. & Nicolas J., 2005. Microbial volatile organic compounds as indicators of fungi. Can an electronic nose detect fungi in indoor environments? *Building+and+Environment* **40**(6), 824–831.
- Larsen T.O. & Frisvad J.C., 1995. Chemosystematics of *Penicillium* based on profiles of volatile metabolites. *Mycol. Res.* **99**(10), 1167–1174.
- Lee S.O., Kim H.Y., Choi G.J., Lee H.B., Jang K.S., Choi Y.H. & Kim J.-C., 2009. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid. *J. Appl. Microbiol.* **106**(4), 1213–1219.
- Lemfack M.C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R. & Piechulla B., 2014. mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* **42**(Database issue), D744–8.
- Li N., Alfiky A., Vaughan M.M. & Kang S., 2016. Stop and smell the fungi: Fungal volatile metabolites are overlooked signals involved in fungal interaction with plants. *Fungal Biol. Rev.* **30**(3), 134–144.
- Li Q., Ning P., Zheng L., Huang J., Li G. & Hsiang T., 2012. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biol. Control* **61**(2), 113–120.
- Liu X.-M. & Zhang H., 2015. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* **6**(September), 774.
- Maceira A., Vallecillos L., Borrull F. & Marcé R.M., 2017. New approach to resolve the humidity problem in VOC determination in outdoor air samples using solid adsorbent tubes followed by TD-GC–MS. *Sci. Total Environ.* **599–600**, 1718–1727.
- Masfria, 2015. Antibacterial activity of ethyl acetate and ethanol extract of *Rhaphidophora pinnata* (L.f) schott leaf against four types of bacteria. *Int. J. ChemTech Res.* **8**(6), 905–914.
- Matysik S., Herbarth O. & Mueller A., 2008. Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media. *J. Microbiol. Methods* **75**(2), 182–187.
- Mburu D.M., Ndung’U M.W., Maniania N.K. & Hassanali A., 2011. Comparison of volatile blends and gene sequences of two isolates of *Metarhizium anisopliae* of different virulence and repellency toward the termite *Macrotermes michaelsoni*. *J. Exp. Biol.* **214**(Pt 6), 956–62.
- McNeill V.F., 2017. Atmospheric Aerosols: Clouds, Chemistry, and Climate. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **8**, 427–444.
- Méndez-Vilas A., 2013. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, Formatex Research Center, 2008.
- Micalizzi E.W., Mack J.N., White G.P., Avis T.J. & Smith M.L., 2017. Microbial inhibitors of the fungus *Pseudogymnoascus destructans*, the causal agent of white-nose syndrome in bats. *PLoS ONE* **12**(6).
- Mitchell A.M., Strobel G.A., Moore E., Robison R. & Sears J., 2010. Volatile antimicrobials from *Muscodora crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **156**(1), 270–277.
- Mitropoulou G., Fitsiou E., Spyridopoulou K., Tiptiri-Kourpeti A., Bardouki H., Vamvakias M., Panas P., Chlichlia K., Pappa A. & Kourkoutas Y., 2017. Citrus medica essential oil exhibits significant antimicrobial and antiproliferative activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **84**, 344–352.
- Miyagawa H., Inoue M., Yamanaka H., Tsurushima T. & Ueno T., 2000. Chemistry of Spore Germination Self-Inhibitors from the Plant Pathogenic Fungus *Colletotrichum fragariae*. In: *Agrochemical Discovery*, ACS Symposium Series. American Chemical Society, 62–71.
- Morath S.U., Hung R. & Bennett J.W., 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biol. Rev.* **26**(2–3), 73–83.

- Müller T., Thißen R., Braun S., Dott W. & Fischer G., 2004. (M)VoC and Composting Facilities Part 1: (M)VOC Emissions from Municipal Biowaste and Plant Refuse. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **11**(2), 91–97.
- Nathalya Isabel de Melo, Carlos Eduardo de Carvalho, Letícia Fracarolli, Wilson Roberto Cunha, Rodrigo Cassio Sola Veneziani, Carlos Henrique Gomes Martins & Antônio Eduardo Miller Crotti, 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **46**(2), 519–525.
- Navickiene H.M.D., Morandim A. de A., Alécio A.C., Regasini L.O., Bergamo D.C.B., Telascrea M., Cavalheiro A.J., Lopes M.N., Bolzani V. da S., Furlan M., Marques M.O.M., Young M.C.M. & Kato M.J., 2006. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quím. Nova* **29**(3), 467–470.
- Naznin H.A., Kiyohara D., Kimura M., Miyazawa M., Shimizu M., Hyakumachi M. & Yang C.-H., 2014. Systemic Resistance Induced by Volatile Organic Compounds Emitted by Plant Growth-Promoting Fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **9**(1).
- Nieminen T., Neubauer P., Sivelä S., Vatamo S., Silfverberg P. & Salkinoja-Salonen M., 2008. Volatile compounds produced by fungi grown in strawberry jam. *LWT - Food Sci. Technol.* **41**(10), 2051–2056.
- Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L. & López-Bucio J., 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* **4**(8), 701–712.
- PACA I.D., 2017. Les émissions de composés organiques volatils (COV). <http://www.paca.developpement-durable.gouv.fr/les-emissions-de-composes-organiques-volatils-cov-r1141.html>, (25/07/2017).
- Paré P., Farag M., Krishnamachari V., Zhang H., Ryu C.-M. & Kloepper J., 2005. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. *Photosynth. Res.* **85**(2), 149–159.
- Paré P.W. & Tumlinson J.H., 1997. De Novo Biosynthesis of Volatiles Induced by Insect Herbivory in Cotton Plants. *Plant Physiol.* **114**(4), 1161–1167.
- Parker J.K., Elmore S. & Methven L., 2014. *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*, Elsevier, 448.
- Paul D. & Park K.S., 2013. Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth. *Sensors* **13**(10), 13969–13977.
- Pickett J.A. & Khan Z.R., 2016. Plant volatile-mediated signalling and its application in agriculture: successes and challenges. *New Phytol. Online* **212**(4), 856–870.
- Pimenta L., Ferreira M.A., Pedroso M.P. & Campos V.P., 2017. Wood-associated fungi produce volatile organic compounds toxic to root-knot nematode. *Sci. Agric.* **74**(4), 303–310.
- Polizzi V., Adams A., Malysheva S.V., De Saeger S., Van Peteghem C., Moretti A., Picco A.M. & De Kimpe N., 2012. Identification of volatile markers for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of *Aspergillus* species. *Fungal Biol.* **116**(9), 941–953.
- Polizzi V., Delmulle B., Adams A., Moretti A., Susca A., Picco A.M., Rosseel Y., Kindt R., Bocxlaer J.V., Kimpe N.D., Peteghem C.V. & Saeger S.D., 2009. JEM Spotlight: Fungi, mycotoxins and microbial volatile organic compounds in mouldy interiors from water-damaged buildings. *J. Environ. Monit.* **11**(10), 1849–1858.
- Quintana-Rodriguez E., Morales-Vargas A.T., Molina-Torres J., Ádame-Alvarez R.M., Acosta-Gallegos J.A. & Heil M., 2015. Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Ecol.* **103**(1), 250–260.

- Raza W., Mei X., Wei Z., Ling N., Yuan J., Wang J., Huang Q. & Shen Q., 2017. Profiling of soil volatile organic compounds after long-term application of inorganic, organic and organic-inorganic mixed fertilizers and their effect on plant growth. *Sci. Total Environ.* **607–608**, 326–338.
- Regnault-Roger C., 2005. *Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement.*, Tec & Doc, Paris, lvii+1013.
- Rohlf M., Obmann B. & Petersen R., 2005. Competition with filamentous fungi and its implication for a gregarious lifestyle in insects living on ephemeral resources. *Ecol. Entomol.* **30**(5), 556–563.
- Rohloff J. & Bones A.M., 2005. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* – Putative olfactory compounds in plant communication. *Phytochemistry* **66**(16), 1941–1955.
- Rouissi W., Ugolini L., Martini C., Lazzeri L. & Mari M., 2013. Control of Postharvest Fungal Pathogens by Antifungal Compounds from *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.* **76**(11), 1879–86.
- Roy A., Singh S.K., Bajpai J. & Bajpai A.K., 2014. Controlled pesticide release from biodegradable polymers. *Cent. Eur. J. Chem.* **12**(4), 453–469.
- Savel'eva E.I., Gavrilova O.P. & Gagkaeva T.Y., 2014. Study of the composition of volatile organic compounds emitted by the filamentous fungus *Fusarium culmorum* by gas chromatography-mass spectrometry combined with solid phase micro-extraction. *Russ. J. Gen. Chem.* **84**(13), 2603–2610.
- Savelieva E.I., Gustyleva L.K., Kessenikh E.D., Khlebnikova N.S., Leffingwell J., Gavrilova O.P. & Gagkaeva T.Y., 2016. Study of the Vapor Phase Over *Fusarium* Fungi Cultured on Various Substrates. *Chem. Biodivers.* **13**(7), 891–903.
- Schalchli H., Tortella G.R., Rubilar O., Parra L., Hormazabal E. & Quiroz A., 2016. Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**(1), 144–152.
- Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M. & Migheli Q., 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol. Plant Pathol.* **14**(4), 323–341.
- Schleibinger H., Brattig C., Mangler M., Samwer H., Laußmann D., Eis D., Braun P., Marchl D., Nickelmann A. & Rueden H., 2002. Microbial volatile organic compounds (MVOC) as indicators for fungal damage. In: *Proceedings of Indoor Air 2002*. 707–712.
- Schnürer J., Olsson J. & Börjesson T., 1999. Fungal Volatiles as Indicators of Food and Feeds Spoilage. *Fungal Genet. Biol.* **27**(2–3), 209–217.
- Service Public Fédéral Belge, 2015. Pesticides et biocides. *Belgium.be*. https://www.belgium.be/fr/environnement/substances_chimiques/pesticides_et_biocides, (12/08/2017).
- Skaltsa H.D., Lazaris D.M. & Loukis A.E., 1999. Composition of the Essential Oil of *Acinos alpinus* (L.) Moench. from Greece. *J. Essent. Oil Res.* **11**(1), 35–37.
- Souza Silva É.A., Saboia G., Jorge N.C., Hoffmann C., Dos Santos Isaias R.M., Soares G.L.G. & Zini C.A., 2017. Development of a HS-SPME-GC/MS protocol assisted by chemometric tools to study herbivore-induced volatiles in *Myrcia splendens*. *Talanta* **175**, 9–20.
- Spinelli F., Cellini A., Marchetti L., Nagesh K.M. & Piovene C., 2011. Emission and Function of Volatile Organic Compounds in Response to Abiotic Stress.
- Splivallo R., Fischer U., Göbel C., Feussner I. & Karlovsky P., 2009. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol.* **150**(4), 2018–2029.

- Splivallo R., Novero M., Bertea C.M., Bossi S. & Bonfante P., 2007. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **175**(3), 417–424.
- Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R. & Schuhmacher R., 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J. Microbiol. Methods* **81**(2), 187–193.
- Strobel G., 2006. *Muscodor albus* and its biological promise. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**(7), 514.
- Strobel G., Singh S.K., Riyaz-Ul-Hassan S., Mitchell A.M., Geary B., Sears J. & Singh S.K., 2011. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiol. Lett.* **320**(2), 87–94.
- Tait E., Perry J.D., Stanforth S.P. & Dean J.R., 2014. Identification of Volatile Organic Compounds Produced by Bacteria Using HS-SPME-GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **52**(4), 363–373.
- Takken W., 1991. The Role of Olfaction in Host-Seeking of Mosquitoes: A Review. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **12**(1–2–3), 287–295.
- Tan C.M., Li C.-H., Tsao N.-W., Su L.-W., Lu Y.-T., Chang S.H., Lin Y.Y., Liou J.-C., Hsieh L.-C., Yu J.-Z., Sheue C.-R., Wang S.-Y., Lee C.-F. & Yang J.-Y., 2016. Phytoplasma SAP11 alters 3-isobutyl-2-methoxypyrazine biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* by suppressing NbOMT1. *J. Exp. Bot.* **67**(14), 4415–4425.
- Tarkka M.T. & Piechulla B., 2007. Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles. *New Phytol.* **175**(3), 381–383.
- The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals, n.d. .
- Theis N. & Lerdau M., 2003. The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *Int. J. Plant Sci.* **164**(S3), S93–S102.
- Tian X., Yao Y., Chen G., Mao Z., Wang X. & Xie B., 2014. Suppression of *Meloidogyne incognita* by the endophytic fungus *Acremonium implicatum* from tomato root galls. *Int. J. Pest Manag.* 1–7.
- Toffano L., Fialho M.B. & Pascholati S.F., 2017. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biol. Control* **108**, 77–82.
- Tournu H., Carroll J., Latimer B., Dragoi A.-M., Dykes S., Cardelli J., Peters T., Eberle K. & Palmer G., 2017. Identification of small molecules that disrupt vacuolar function in the pathogen *Candida albicans*. *PLoS One* **12**(2).
- Tsuruta K., Yoshida Y., Kusumoto N., Sekine N., Ashitani T. & Takahashi K., 2011. Inhibition activity of essential oils obtained from Japanese trees against *Skeletonema costatum*. *J. Wood Sci.* **57**(6), 520–525.
- Ueda H. & Matsuda K., 2011. VOC-mediated within-plant communications and nonvolatile systemic signals upregulate pyrethrin biosynthesis in wounded seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium*. *J. Plant Interact.* **6**(2–3), 89–91.
- Vas G. & Vékey K., 2004. Solid-phase micro-extraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.* **39**(3), 233–254.
- Verheggen F., Arnaud L., Capella Q., Francis F. & Haubruge E., 2005. Perception of aphid infested tomato plant volatiles by the predator *Episyrphus balteatus*. *Communications+in+Agricultural+and+Applied+Biological+Sciences*.
- Vuorinen T., Reddy G.V.P., Nerg A.-M. & Holopainen J.K., 2004. Monoterpene and herbivore-induced emissions from cabbage plants grown at elevated atmospheric CO₂ concentration. *Atmos. Environ.* **38**(5), 675–682.
- Wang M., Gu D., Li H., Wang Q., Kang J., Chu T., Guo H., Yang Y. & Tian J., 2017. Rapid prediction and identification of lipase inhibitors in volatile oil from *Pinus massoniana* L. needles. *Phytochemistry* **141**, 114–120.

- Wheatley R.E., 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**(1–4), 357–364.
- Yang Q., Chen Y. & Ma Z., 2013. Involvement of BcVeA and BcVelB in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genet. Biol.* **50**, 63–71.
- Zhang Z. & Li G., 2010. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.* **95**(2), 127–139.
- Zunino M.P., Herrera J.M., Pizzolitto R.P., Rubinstein H.R., Zygodlo J.A. & Dambolena J.S., 2015. Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus *Fusarium verticillioides* and the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *J. Agric. Food Chem.* **63**(35), 7743–9.

ANNEXE I - Code Matlab® des traitements de données des fichiers de sortie du GC-MS

```
%% Mise en forme de la table des données
%=> je garde donc que le nom de la première molécule de chaque prise de
mesure
clc
clearvars
close all

startrow = 16 ;
endrow = 364 ; % à changer manuellement
L = endrow-startrow+1 ;

%change le nom du fichier à lire
[No,RT,area,COVs,ref,CAS,qual] = impVectorsFun('CS_106_14_4.txt',
startrow, endrow);

%indices des cases qui sont remplies par un chiffre
%Reconnais les lignes de No occupé
cpt = 0 ;
for i = 1:L
    if not(isempty(No{i}))
        cpt = cpt + 1 ;
        idx(cpt,1) = i ;
    end
end
%% remets les noms des molécules en une ligne

cpt = 1 ;
for i = 1:numel(idx)-1 % numel indique d'aller jusqu'au nombre de ligne de
idx
    Name{cpt}='';
    for j = idx(i)+1 : idx(i+1)-2
        if not(isempty(CAS{j}))
            cpt = cpt + 1 ;
            Name{cpt} = [COVs{j} COVs{j+1}] ;
        end
    end
    cpt = cpt + 1;
end
Name = Name';% mise en colonne
Name = strtrim(Name);

%% Garde que le nom de la première molécule par prise
cpt=1;
for i=1:numel(Name)
    %     newName(k)=COVs(idx(i));
    %     k = k + 1;
    if isempty(Name{i})
        newName(cpt)=Name(i+1);
        cpt = cpt + 1 ;
    end
end
newName=newName';

% isempty permet d'enlever les espaces et les cases vides
area = area(~cellfun('isempty',area));
```

```

RT    = RT(~cellfun('isempty',RT));

%% permets de remettre en format comme le txt

No = cell(size(newName)) ;
RTo = cell(size(newName));
area0 = cell(size(newName));
for i = 1:numel(newName)
    No{i} = i ;
    area0{i} = area{i} ;
    RTo{i} = RT{i};
end

%% Mise en forme comme le newName avec les données que de la première
molécule
refo = cell(size(newName)) ;
CASo = cell(size(newName)) ;
qualo = cell(size(newName)) ;
k=1;
for i=1:numel(idx)-1
    refo(k)=ref(idx(i)+1);
    qualo(k)=qual(idx(i)+1);
    CASo(k)=CAS(idx(i)+1);
    k=k+1;
end

%% remise en une seule table et avoir une seule fois le même composé
echant=table(No,RTo,area0,newName,refo,CASo,qualo);
[CAS_e,l1,c1]=unique(echant(:,6),'stable');
echant4=echant(l1,:);

```

```

%% Code de comparaison des molécules communes aux échantillon selon le CAS
clear all
%% Comparaison échantillons 1 et 2
% Code de Laurent

load('echant1.mat')
load('echant2.mat')
load('echant3.mat')
load('echant4.mat')

%% comparaison de l'échantillon 1 et 2
comparaison12=cell(1,2*width(echant1(:,1)));
comparaison12=cell2table(comparaison12);
k = 1;
for i=1:height(echant1)
    for j = 1: height(echant2)
        if isequal(echant1.CASo{i}, echant2.CASo{j})
            comparaison12(k,1:7) = echant1(i,:);
            comparaison12(k,8:14) = echant2(j,:);
            k = k + 1;
        end
    end
end
end

```

```

%% Comparaison de l'échantillon 2 et 3
comparaison23=cell(1,2*width(echant1(:,2)));
comparaison23=cell2table(comparaison23);
k = 1;
for i=1:height(echant2)
    for j = 1: height(echant3)
        if isequal(echant2.CASo{i}, echant3.CASo{j})
            comparaison23(k,1:7) = echant2(i,:);
            comparaison23(k,8:14) = echant3(j,:);
            k = k + 1;
        end
    end
end

%% Comparaison de l'échantillon 3 et 4
comparaison34=cell(1,2*width(echant1(:,2)));
comparaison34=cell2table(comparaison34);
k = 1;
for i=1:height(echant3)
    for j = 1: height(echant4)
        if isequal(echant3.CASo{i}, echant4.CASo{j})
            comparaison34(k,1:7) = echant3(i,:);
            comparaison34(k,8:14) = echant4(j,:);
            k = k + 1;
        end
    end
end

%% Comparaison échantillon 1 et 3
comparaison13=cell(1,2*width(echant1(:,1)));
comparaison13=cell2table(comparaison13);
k = 1;
for i=1:height(echant1)
    for j = 1: height(echant3)
        if isequal(echant1.CASo{i}, echant3.CASo{j})
            comparaison13(k,1:7) = echant1(i,:);
            comparaison13(k,8:14) = echant3(j,:);
            k = k + 1;
        end
    end
end

%% Comparaison échantillon 1 et 4
comparaison14=cell(1,2*width(echant1(:,1)));
comparaison14=cell2table(comparaison14);
k = 1;
for i=1:height(echant1)
    for j = 1: height(echant4)
        if isequal(echant1.CASo{i}, echant4.CASo{j})
            comparaison14(k,1:7) = echant1(i,:);
            comparaison14(k,8:14) = echant4(j,:);
            k = k + 1;
        end
    end
end

%% Comparaison de l'échantillon 2 et 3
comparaison24=cell(1,2*width(echant1(:,2)));
comparaison24=cell2table(comparaison24);
k = 1;
for i=1:height(echant2)
    for j = 1: height(echant4)

```



```

        if isequal(echant2.CASo{i}, echant4.CASo{j})
            comparaison24(k,1:7) = echant2(i,:);
            comparaison24(k,8:14) = echant4(j,:);
            k = k + 1;
        end
    end
end

%% Comparaison totale 12 et 34
commun=cell(1,2*width(comparaison12(:,1)));
commun=cell2table(commun);
k = 1;
for i=1:height(comparaison12(:,1))
    for j =1: height(comparaison34(:,1))
        if isequal(comparaison12.Var6{i}, comparaison34.Var6{j})
            commun(k,1:14) = comparaison12(i,:);
            commun(k,15:28) = comparaison34(j,:);
            k = k + 1;
        end
    end
end

%% enregistrement des résultats
save('comparaison12.mat','comparaison12');
save('comparaison13.mat','comparaison13');
save('comparaison14.mat','comparaison14');
save('comparaison23.mat','comparaison23');
save('comparaison24.mat','comparaison24');
save('comparaison34.mat','comparaison34');
save('commun.mat','commun');

%% écriture des résultats dans un fichier excel
load('Vial.mat')
load('Milieu.mat')
load('Colonne.mat')
filename='CS_106_14j.xlsx';
writetable(comparaison12,filename,'Sheet',1,'Range','A1')
writetable(comparaison13,filename,'Sheet',2,'Range','A1')
writetable(comparaison14,filename,'Sheet',3,'Range','A1')
writetable(comparaison23,filename,'Sheet',4,'Range','A1')
writetable(comparaison24,filename,'Sheet',5,'Range','A1')
writetable(comparaison34,filename,'Sheet',6,'Range','A1')
writetable(commun,filename,'Sheet',7,'Range','A1')
writetable(Colonne,filename,'Sheet',8,'Range','A1')
writetable(Vial,filename,'Sheet',8,'Range','H1')
writetable(Milieu,filename,'Sheet',8,'Range','O1')

```

ANNEXE II : Comparaison des méthodes d'analyse du GC-MS avant et après la panne du 3 avril 2017.

INSTRUMENT,CONTROL	INSTRUMENT,CONTROL
PARAMETERS: TDS-GC-MS	PARAMETERS: TDS-GC-MS
C:\MSDCHEM\1\METHODS\Invités\Caroline\VOCACTION151214.M	C:\MSDCHEM\1\METHODS\Invités\Caroline\VOCACTION151214.M
Thu Mar 16 13:04:15 2017	Thu May 04 13:22:22 2017
Control Information	Control Information
Sample Inlet : GC	Sample Inlet : GC
Injection Source : Manual	Injection Source : Manual
Mass Spectrometer : Enabled	Mass Spectrometer : Enabled
Injection Location: Front	Injection Location: Front
No Sample Prep method has been assigned to this method.	No Sample Prep method has been assigned to this method.
6890 GC METHOD	6890 GC METHOD
OVEN	OVEN
Equilibration time: 0.50 min	Equilibration time: 0.50 min
Maximum temp: 260 C	Maximum temp: 320 C
Initial temp: 35 C (On)	Initial temp: 35 C (On)
Initial time: 2.00 min	Initial time: 2.00 min
Ramps:	Ramps:
# Rate Final temp Final time	# Rate Final temp Final time
1 5.00 155 0.00	1 5.00 155 0.00
2 20.00 250 10.00	2 20.00 250 10.00
3 0 (Off)	3 0 (Off)
Post temp: 0 C	Post temp: 0 C
Post time: 0.00 min	Post time: 0.00 min
Run time: 40.75 min	Run time: 40.75 min
FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)	FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)
Mode: Pulsed Splitless	Mode: Pulsed Splitless
Initial temp: 250 C (On)	Initial temp: 250 C (On)
Pressure: 80 kPa (On)	Pressure: 80 kPa (On)
Pulse pressure: 206 kPa	Pulse pressure: 206 kPa

Pulse time: 1.00 min Purge flow: 50.0 mL/min Purge time: 1.00 min Total flow: 54.5 mL/min Gas saver: On Saver flow: 20.0 mL/min Saver time: 2.00 min Gas type: Helium BACK INLET (CIS4) Mode: Split Initial temp: 0 C (Off) Pressure: 58 kPa (Off) Split ratio: 50:1 Split flow: 94.2 mL/min Total flow: 99.0 mL/min Gas saver: Off Gas type: Helium COLUMN 1 Capillary Column Model Number: CP9205 Description: VF-WAXms Max temperature: 250 C Nominal length: 30.0 m Nominal diameter: 250.00 um Nominal film thickness: 0.25 um Mode: constant flow Initial flow: 1.5 mL/min Nominal init pressure: 80 kPa Average velocity: 44 cm/sec Inlet: Front Inlet Outlet: MSD Outlet pressure: vacuum COLUMN 2 Capillary Column	Pulse time: 1.00 min Purge flow: 50.0 mL/min Purge time: 1.00 min Total flow: 54.5 mL/min Gas saver: On Saver flow: 20.0 mL/min Saver time: 2.00 min Gas type: Helium BACK INLET (CIS4) Mode: Split Initial temp: 0 C (Off) Pressure: 0 kPa (Off) Total flow: 45.0 mL/m Gas saver: Off Gas type: Helium COLUMN 1 Capillary Column Model Number: CP9205 Description: VF-WAXms Max temperature: 250 C Nominal length: 30.0 m Nominal diameter: 250.00 um Nominal film thickness: 0.25 um Mode: constant flow Initial flow: 1.5 mL/min Nominal init pressure: 80 kPa Average velocity: 44 cm/sec Inlet: Front Inlet Outlet: MSD Outlet pressure: vacuum COLUMN 2 (not installed)
--	--

<p>Nominal length: 30.0 m</p> <p>Nominal diameter: 320.00 um</p> <p>Nominal film thickness: 0.00 um</p> <p>Mode: constant flow</p> <p>Initial flow: 1.9 mL/min</p> <p>Nominal init pressure: 58 kPa</p> <p>Average velocity: 31 cm/sec</p> <p>Inlet: Back Inlet</p> <p>Outlet: (other)</p> <p>Outlet pressure: ambient</p> <p>FRONT DETECTOR (FID)</p> <p>Temperature: 250 C (Off)</p> <p>Hydrogen flow: 40.0 mL/min (Off)</p> <p>Air flow: 450.0 mL/min (Off)</p> <p>Mode: Constant makeup flow</p> <p>Makeup flow: 45.0 mL/min (Off)</p> <p>Makeup Gas Type: Nitrogen</p> <p>Flame: Off</p> <p>Electrometer: Off</p> <p>Lit offset: 2.0</p> <p>BACK DETECTOR (NO DET)</p> <p>SIGNAL 1</p> <p>Save Data: Off</p> <p>SIGNAL 2</p> <p>Save Data: Off</p> <p>THERMAL AUX 2</p> <p>Use: MSD Transfer Line Heater</p> <p>Initial temp: 260 C (On)</p> <p>POST RUN</p> <p>Post Time: 0.00 min</p> <p>INJECTOR 2</p> <p>Solvent Wash Mode: A, B</p> <p>Sample pumps: 0</p> <p>Sample Volume (uL): 1.000</p>	<p>FRONT DETECTOR (FID)</p> <p>Temperature: 250 C (Off)</p> <p>Hydrogen flow: 40.0 mL/min (Off)</p> <p>Air flow: 450.0 mL/min (Off)</p> <p>Mode: Constant makeup flow</p> <p>Makeup flow: 45.0 mL/min (Off)</p> <p>Makeup Gas Type: Nitrogen</p> <p>Flame: Off</p> <p>Electrometer: Off</p> <p>Lit offset: 2.0</p> <p>BACK DETECTOR (NO DET)</p> <p>SIGNAL 1</p> <p>Save Data: Off</p> <p>SIGNAL 2</p> <p>Save Data: Off</p> <p>THERMAL AUX 2</p> <p>Use: MSD Transfer Line Heater</p> <p>Initial temp: 260 C (On)</p> <p>POST RUN</p> <p>Post Time: 0.00 min</p> <p>INJECTOR 2</p> <p>Solvent Wash Mode: A, B</p> <p>Sample pumps: 5</p> <p>Sample Volume (uL): 1.000</p>
---	--

<p>Syringe size (uL): 10.0</p> <p>Pre washes from bottle A: 0</p> <p>Pre washes from bottle B: 0</p> <p>Post washes from bottle A: 0</p> <p>Post washes from bottle B: 0</p> <p>Viscosity delay (seconds): 0</p> <p>Pre injection dwell (min): 0.00</p> <p>Post injection dwell (min): 0.00</p> <p>Sample skim depth (mm): 0.0 (Off)</p> <p>Plunger Speed: Fast</p> <p>Draw Speed (uL/min): 300</p> <p>Dispense Speed (uL/min): 6000</p> <p>Inject Speed (uL/min): 6000</p> <p>Solv Draw Speed (uL/min): -2147483648</p> <p>Solv Dispense Speed (uL/min): -214748</p> <p>Solvent saver: Off</p> <p>Normal Injection: On</p> <p>Air gap after Layer 1 (uL): 0.200</p> <p>ALS ERRORS:</p> <p>On missing vial: pause</p> <p>TIME TABLE</p> <table> <tr> <th>Time(min)</th> <th>Parameter & Setpoint</th> </tr> </table> <p>Column 1 Inventory Number :</p> <p>Column 2 Inventory Number :</p> <p>GERSTEL MAESTRO</p> <p>SYSTEM SETTINGS</p> <table> <tr> <td>Maestro Runtime</td> <td>: 40.75 min</td> </tr> <tr> <td>GC Cool Down Time</td> <td>: 7.00 min</td> </tr> <tr> <td>Cryo Timeout</td> <td>: 15.00 min</td> </tr> </table> <p>GERSTEL CI</p> <p>CRYO COOLING</p> <table> <tr> <td>Cryo Cooling</td> <td>: not used</td> </tr> </table> <p>TEMPERATURE PROGRAM</p>	Time(min)	Parameter & Setpoint	Maestro Runtime	: 40.75 min	GC Cool Down Time	: 7.00 min	Cryo Timeout	: 15.00 min	Cryo Cooling	: not used	<p>Syringe size (uL): 10.0</p> <p>Pre washes from bottle A: 4</p> <p>Pre washes from bottle B: 0</p> <p>Post washes from bottle A: 0</p> <p>Post washes from bottle B: 4</p> <p>Viscosity delay (seconds): 0</p> <p>Pre injection dwell (min): 0.00</p> <p>Post injection dwell (min): 0.00</p> <p>Sample skim depth (mm): 0.0 (Off)</p> <p>Plunger Speed: Fast</p> <p>Draw Speed (uL/min): 300</p> <p>Dispense Speed (uL/min): 6000</p> <p>Inject Speed (uL/min): 6000</p> <p>Solv Draw Speed (uL/min): 300</p> <p>Solv Dispense Speed (uL/min): 6000</p> <p>Multiple Injections: Off</p> <p>Solvent saver: Off</p> <p>Normal Injection: On</p> <p>Air gap after Layer 1 (uL): 0.200</p> <p>ALS ERRORS:</p> <p>On missing vial: pause</p> <p>TIME TABLE</p> <table> <tr> <th>Time(min)</th> <th>Parameter & Setpoint</th> </tr> </table> <p>Column 1 Inventory Number :</p> <p>Column 2 Inventory Number :</p> <p>GERSTEL MAESTRO</p> <p>SYSTEM SETTINGS</p> <table> <tr> <td>Maestro Runtime</td> <td>: 40.75 min</td> </tr> <tr> <td>GC Cool Down Time</td> <td>: 7.00 min</td> </tr> <tr> <td>Cryo Timeout</td> <td>: 15.00 min</td> </tr> </table> <p>GERSTEL CIS</p> <p>CRYO COOLING</p> <table> <tr> <td>Cryo Cooling</td> <td>: not used</td> </tr> </table> <p>TEMPERATURE PROGRAM</p>	Time(min)	Parameter & Setpoint	Maestro Runtime	: 40.75 min	GC Cool Down Time	: 7.00 min	Cryo Timeout	: 15.00 min	Cryo Cooling	: not used
Time(min)	Parameter & Setpoint																				
Maestro Runtime	: 40.75 min																				
GC Cool Down Time	: 7.00 min																				
Cryo Timeout	: 15.00 min																				
Cryo Cooling	: not used																				
Time(min)	Parameter & Setpoint																				
Maestro Runtime	: 40.75 min																				
GC Cool Down Time	: 7.00 min																				
Cryo Timeout	: 15.00 min																				
Cryo Cooling	: not used																				

Initial Temperature : 80 'C	Initial Temperature : 80 'C
Equilibration Time : 1.00 min	Equilibration Time : 1.00 min
Initial Time : 0.10 min	Initial Time : 0.10 min
Ramp 1	Ramp 1
Rate : 10.00 'C/s	Rate : 10.00 'C/s
End Temp : 250 'C	End Temp : 250 'C
Hold Time : 1.00 min	Hold Time : 1.00 min
Ramp 2	Ramp 2
Rate : 0.0 'C/s	Rate : 0.0 'C/s
MS ACQUISITION PARAMETERS	MS ACQUISITION PARAMETERS
General Information	General Information
Tune File : atune.u	Tune File : atune.u
Acquisition Mode : Scan	Acquisition Mode : Scan
MS Information	MS Information
Solvent Delay : 0.00 min	Solvent Delay : 0.00 min
EMV Mode : Gain Factor	EMV Mode : Gain Factor
Gain Factor : 1.00	Gain Factor : 1.00
Resulting EM Voltage : 1918	Resulting EM Voltage : 1918
[Scan Parameters]	[Scan Parameters]
Low Mass : 20.0	Low Mass : 20.0
High Mass : 350.0	High Mass : 350.0
Threshold : 150	Threshold : 150
Sample # : 2 A/D Samples 4	Sample # : 2 A/D Samples 4
Plot 2 low mass : 50.0	Plot 2 low mass : 50.0
Plot 2 high mass : 550.0	Plot 2 high mass : 550.0
[MSZones]	[MSZones]
MS source : 230 C maximum 250 C	MS Source : 230 C maximum 250 C
MS Quad : 150 C maximum 200 C	MS Quad : 150 C maximum 200 C
END OF MS ACQUISITION PARAMETERS	END OF MS ACQUISITION PARAMETERS
TUNE PARAMETERS for SN: US10462293	TUNE PARAMETERS for SN: US10462293
Trace Ion Detection is OFF.	Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION : 34.610	EMISSION : 34.610
ENERGY : 69.922	ENERGY : 69.922
REPELLER : 16.050	REPELLER : 24.762
IONFOCUS : 62.635	IONFOCUS : 71.176
ENTRANCE_LE : 14.500	ENTRANCE_LE : 2.500
EMVOLTS : 2294.118	EMVOLTS : 1858.824
Actual EMV : 1917.65	Actual EMV : 1917.65
GAIN FACTOR : 0.98	GAIN FACTOR : 1.02
AMUGAIN : 2588.000	AMUGAIN : 2580.000
AMUOFFSET : 138.000	AMUOFFSET : 139.000
FILAMENT : 1.000	FILAMENT : 1.000
DCPOLARITY : 0.000	DCPOLARITY : 0.000
ENTLENDOFFS : 14.055	ENTLENDOFFS : 16.816
MASSGAIN : 411.000	MASSGAIN : 410.000
MASSOFFSET : -8.000	MASSOFFSET : -8.000
END OF TUNE PARAMETERS	END OF TUNE PARAMETERS
PostRun InstCntl macro(s) exist: msacq2.mac	PostRun InstCntl macro(s) exist:
END OF INSTRUMENT CONTROL	msacq2.mac
PARAMETERS	END OF INSTRUMENT CONTROL
	PARAMETERS