

Développements analytiques et approche métabolomique pour l'étude des composés volatils d'origine végétale: Application à l'étude du dépérissement de la lavande

Emilie Stierlin

► To cite this version:

Emilie Stierlin. Développements analytiques et approche métabolomique pour l'étude des composés volatils d'origine végétale : Application à l'étude du dépérissement de la lavande. Biologie végétale. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ4008 . tel-03000578

HAL Id: tel-03000578 https://theses.hal.science/tel-03000578

Submitted on 12 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





THÈSE DE DOCTORAT

Développements analytiques et approche métabolomique pour l'étude des composés volatils d'origine végétale

Application à l'étude du dépérissement de la lavande

Émilie STIERLIN

Institut de Chimie de Nice

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Chimie de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. Thomas Michel Co-encadrée par : Pr. Xavier Fernandez Soutenue le : 3 mars 2020 Devant le jury, composé de :
Pascal Cardinaël, Professeur, Université de Rouen-Normandie, Rapporteur
Catherine Fernandez, Professeur, Aix-Marseille Université, Rapporteur
Anne-Violette Lavoir, Maître de conférences, Université Côte d'Azur, Examinateur
Florence Nicolè, Maître de conférences, Université Jean-Monnet, Examinateur
Thomas Michel, Maître de conférences, Université Côte d'Azur, Directeur de thèse
Xavier Fernandez, Professeur, Université Côte d'Azur, Co-encadrant de thèse

Développements analytiques et approche métabolomique pour l'étude des composés volatils d'origine végétale Application à l'étude du dépérissement de la lavande

Jury :

Président du jury Pascal Cardinaël	Professeur	Université de Rouen-Normandie
Rapporteurs	Professeur	Aiy-Marseille Université
Pascal Cardinaël	Professeur	Université de Rouen-Normandie
Examinateurs		
Anne-Violette Lavoir	Maître de conférences	Université Côte d'Azur
Florence Nicolè	Maître de conférences	Université Jean-Monnet
Directeur de thèse		
Thomas Michel	Maître de conférences	Université Côte d'Azur
Co-encadrant de these Xavier Fernandez	Professeur	Université Côte d'Azur

Développements analytiques et approche métabolomique pour l'étude des composés volatils d'origine végétale

Application à l'étude du dépérissement de la lavande

<u>Résumé</u> :

En écologie chimique, les composés organiques volatils (COVs) qui interviennent dans la survie des plantes et leur adaptation à l'environnement présentent un intérêt scientifique majeur. Néanmoins, leur étude nécessite de développer des outils analytiques performants en raison des faibles teneurs en métabolites, de la complexité des mélanges à analyser et de la diversité structurale des molécules d'intérêts.

Depuis une quinzaine d'années, les cultures de lavande et lavandin subissent un important déclin en raison de la propagation du dépérissement de la lavande due à une bactérie pathogène (*Candidatus* Phytoplasma mali) transmise par un insecte (*Hyalesthes obsoletus*). L'objectif de cette thèse a donc consisté à développer des méthodes de piégeage et d'analyse des COVs potentiellement impliqués dans le dépérissement. Ce travail a été réalisé sur plusieurs variétés de lavande et lavandin symptomatiques ou asymptomatiques, et connues pour être sensibles ou tolérantes au dépérissement. Ainsi, une approche métabolomique combinant la microextraction sur phase solide (SPME) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) a permis de caractériser pour la première fois les composés émis par les racines en laboratoire et sur le terrain. Une deuxième partie a consisté à appliquer une méthode d'extraction en espace de tête dynamique (DHS), une désorption thermique automatisée (ATD) ainsi qu'une analyse par GC-MS permettant de piéger et analyser les COVs émis par les parties aériennes des plantes directement dans leur environnement naturel. Les COVs stockés dans ces mêmes parties aériennes (inflorescences et feuilles) ont ensuite été extraits dans l'hexane par extraction assistée aux ultrasons (UAE) et analysés par GC-MS. À la suite du traitement des données par analyses discriminantes (PLS-DA), des marqueurs spécifiques des caractères sensibles/tolérants ainsi que asymptomatiques/symptomatiques ont pu être mis en évidence.

Mots-clés : genre Lavandula, COVs, (ATD-)GC-MS, métabolomique.

Development of analytical strategies and metabolomic approach to study plant volatile compounds

Application to lavender yellow decline disease

Abstract:

In chemical ecology, the volatile organic compounds (VOCs) involved in plant survival and adaptation to the environment are of major scientific interest. Nevertheless, their study requires the development of high-performance analytical tools due to the low levels of metabolites, the complexity of the mixtures to be analysed and the structural diversity of the molecules of interest.

For a few years now, lavender fields are suffering from a severe decline in France due to the propagation of the yellow decline disease, associated with the presence of a bacterium (*Candidatus* Phytoplasma mali) transmitted by an insect (*Hyalesthes obsoletus*). The objective of this thesis was therefore to develop methods for trapping and analysing the VOCs potentially involved in the yellow decline disease. This work was carried out on several symptomatic and asymptomatic lavender and lavandin varieties, known to be sensitive or tolerant to the disease. Thus, the compounds emitted by the roots in the laboratory and in the field were characterised for the first time by a metabolomic approach combining solid phase microextracion (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A second part consisted in applying a dynamic headspace extraction (DHS), automated thermal desorption (ATD), and GC-MS method to trap and analyse the VOCs emitted by the aerial parts of plants directly in their field environment. The VOCs stored in these same aerial parts (inflorescences and leaves) were extracted in hexane by ultrasound assisted extraction (UAE) and analysed by GC-MS. After discriminant analysis (PLS-DA), specific markers for sensitive/tolerant as well as for asymptomatic/symptomatic plants could be identified.

Keywords: Lavandula genus, VOCs, (ATD-)GC-MS, metabolomic

Cette thèse a été menée au sein de l'Institut de Chimie de Nice et a été financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Après ces trois années, je suis persuadée que la thèse est loin d'être un travail individuel. Je ne serais jamais arrivée à franchir les obstacles de cette course sans les connaissances, la générosité et le soutien de nombreuses personnes.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Élisabet Dunach et le Pr. Uwe Meierhenrich, qui ont été successivement directrice et directeur de l'Institut de Chimie de Nice, pour m'avoir accueillie et pour m'avoir permis de réaliser ces études.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury d'avoir évalué mon travail :

- Pascal Cardinaël, professeur à l'université de Rouen-Normandie, ainsi que Catherine Fernandez, professeur à Aix-Marseille Université, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.
- Anne-Violette Lavoir, Maître de conférences à l'université Côte d'Azur et Florence Nicolè, Maître de conférences à l'université Jean-Monnet de Saint-Étienne pour leur présence en tant qu'examinatrices au sein du jury de thèse.

Je souhaite remercier Xavier Fernandez, pour m'avoir acceptée au sein du groupe MVBV, ainsi que pour son intérêt, ses nombreux conseils et sa rigueur scientifique durant ces trois années. Tu as su être un guide autant touristique (avec du Michel Sardou en musique de fond), que dans le choix de bonnes directions à prendre durant ma thèse. Merci.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Thomas Michel, pour son implication, son soutien et sa confiance tout au long de ce projet. En plus d'avoir été un encadrant au top, tu as su être à l'écoute à tout moment et tu as su me convaincre que, malgré tout, la thèse ce n'est pas si mal. Un grand merci pour toutes nos discussions autant professionnelles que privées que ce soit au bureau, autour d'un verre ou dans les champs de lavande (#sauvonslalavande) !

~

Je tiens à remercier tous les partenaires du projet EUCLIDE au sein duquel j'ai eu la chance de participer.

Ce travail n'aurait pas été possible sans leur motivation et leur soutien durant ces trois années. Je souhaite remercier Éric Chaisse, coordinateur général du Fonds de dotation de Sauvegarde du Patrimoine Lavandes en Provence ainsi que Thomas Costes, Jean-Baptiste Rivoal et Delphine Fraty pour leur investissement et leur accueil chaleureux à chacune de nos visites au CRIEPPAM. Merci au CEFE, à Benoît Lapeyre et Magali Proffit pour leurs conseils et remarques pertinentes sur mes travaux. Merci à Éric Verdin de l'INRA d'Avignon. J'adresse également mes remerciements aux sociétés Bontoux et Chanel pour le financement apporté au projet. Je remercie Pierre-Philippe Garry, directeur technique chez Bontoux, pour sa générosité et son implication dans le projet. Merci à Carol Surot, directrice Affaires Réglementaires, Sécurité & Filières Durables Parfums, Claire Chinsky-Thomas, responsable RSE ainsi que Marion Morel, chargée de RSE Parfums chez Chanel pour leur suivi avec intérêt des avancées du projet. Je souhaite terminer ces remerciements par Florence Nicolè du LBVPAM. Un grand merci à toi Florence pour ton soutien, ta motivation, ta transmission de savoirs pour les stats, tes précieux conseils et ton extrême gentillesse !

Merci à tout le groupe « échantillonnage » : Béné, Florence, Thomas M, Thomas C, ainsi qu'Élisa. Ces journées sur le terrain au milieu des champs de lavande, à prendre des coups de soleil avec vue sur le mont Ventoux, ont été une très chouette expérience en votre compagnie ! J'en garderai de beaux souvenirs !

Et puis, merci à Bénédicte, ma collègue COnVs, pour l'entraide dans les expériences au labo, l'arrosage des plants de lavande et le soutien lors de coups de stress.

Merci à vous tous pour nos multiples échanges enrichissants que nous avons pu avoir et qui m'ont permis de faire le point et prendre du recul sur ma thèse.

~

Je souhaite remercier tous ceux qui m'ont aidé et qui ont participé d'une façon ou d'une autre à ma thèse.

- Merci au GDR MediatEC, au RFMF ainsi qu'au laboratoire de RIBP de Reims qui m'ont permis de participer à leur congrès en m'offrant une bourse de voyage.
- Merci à Michèle Ude et sa scie à diamant pour avoir découpé les vials headspace avec facilité et rapidité alors que ça faisait des mois que je testais des remèdes soidisant « magiques » au laboratoire. Et merci également à Frédéric Lippi ainsi que ses collaborateurs de l'atelier qui ont découpé les plaques pour mon dispositif headspace 6 voies.
- Merci aux jardiniers de Valrose, Gilles, Jean-François et Mathieu pour nous avoir fait de la place pour nos lavandes.
- Un grand merci aux jardins du MIP, à Christophe Mège et toute l'équipe pour leur accueil chaleureux lors des quelques jours d'échantillonnages.
- Merci à Christian Missitch et Nicolas Bongard de la société PerkinElmer pour les échanges que nous avons pu avoir.
- Grand merci à Stéphane Greff pour l'aide précieuse sur le package Erah, script qui m'a sauvé pour le traitement des données GC-MS.

~

Je tiens à exprimer mes remerciements aux secrétaires de l'ICN pour avoir fait preuve de patience et d'arrangement dans les commandes/missions.

Je souhaite aussi remercier les personnes qui ont partagé les TPs que j'ai dispensés dans le cadre de mes charges d'enseignements. Merci Luc, Thomas, Marion, Manon ainsi que tous les étudiants que j'ai pu côtoyer ! J'ai été ravie de partager cette expérience d'enseignement avec vous !

J'exprime également mes remerciements à Gaëlle pour avoir été une responsable des doctorants parfaite, toujours avec le sourire.

Je tiens à remercier tous les collègues de bureau, labo, pauses midi... !

Je remercie tout le groupe MVBV pour leur disponibilité que ce soit pour des conseils ou pour répondre à mes interrogations mais aussi pour les bons moments passés lors des sorties randonnées, ski ou restau ! Je souhaite remercier particulièrement Camille pour son aide, ses explications et ses muscles quand il fallait dompter l'ATD (qui nous en a bien fait baver). Merci Anne-So pour la belle personne au grand cœur que tu es et ta présence quand j'en avais besoin. Merci aussi à Anne-Vio et Christine pour votre amabilité et votre aide. Un grand merci à toi Anne-Vio pour tes conseils. Et puis, grâce (ou à cause) de toi les rando bota de 4h duraient au moins le double !

Merci aux personnes du 2^e étage, 3^e niveau, toujours présentes pour des coups de main au labo ou des conseils précieux. Merci JJ pour ton aide précieuse sur les appareils, tu as été Mr Wolf du labo, et merci aussi pour ton humour et tes blagues (que je ne comprenais pas toujours) ! Merci Conny pour tes conseils, ta bonne humeur, tes chocolats, ton soutien, en plus d'être une collègue tu es une personne sur qui j'ai pu compter !

Grand merci à ceux qui ont dû me supporter au quotidien au bureau 325 : spéciale dédicace à Loïc qui a toujours été là pour donner un coup de main, Flo La Diva pour avoir été une confidente en plus d'une voisine de bureau, mes deux psychologues Adrien le corse avec qui rien n'est impossible ainsi que Raph le furet taré accro au KFC (ou aux légumes ? #résolution2020) et Béné, lavandula girl ! Même s'il était parfois dur de se concentrer après 18h, entre vos blagues de haut niveau et les parties de mini-billard, vous avez malgré tout réussi à me faire rire et contribué à ce bureau des légendes, merci !

Merci aux stagiaires de passage que j'ai pu côtoyer et qui ont été adorables : Anaïs, Ariane, Coline (avec qui les discussions au labo -ou ailleurs- donnaient tout de suite le sourire), Choupinou, Cyrielle, Djamila, Élodie, Mariam, Mathieu et Tara pour son aide sur l'anglais et sa gentillesse hors norme (restes comme tu es, une fille formidable !).

Je remercie les équipes MAPEC et RHE pour m'avoir adopté parmi les leurs et pour les instants partagés lors des repas de midi, des pauses goûters ou pour les verres échangés en dehors de l'ICN. Vous saviez me faire retrouver le sourire même quand ça n'allait pas. Un grand merci en particulier à Aurélie pour sa gentillesse et son aide précieuse pour la préparation de dossier CNRS.

J'ai une pensée reconnaissante à tous ceux qui ont partagé des bouts de mon chemin de thèse et qui ont été là chacun à leur manière pour me changer les idées et s'inquiéter de mon sort. Pour ne citer que certains : Hélène pour les sorties messes, les apéros et ta joie de vivre inégalable, Lorenzo et Diana pour votre optimisme, votre bonté et votre bonne humeur, Jana, J-C (promis, la poutine je viendrais la prendre à la source !), JB et Julia (et Maïa !), Caro, Corentin, Cyril, Elena, Estelle, Guiseppe, Haruna, Manue, Marie, Mathilde, Najiba, Pierluigi, Romain, Tammy et Xiao pour les apéro-repas-bbq au top.

Merci à mes collègues de footing sans qui l'expérience semi-marathon n'aurait pas été possible. Merci Anne-So, Charlotte, Conny, Hélène, Jérèm, Laurane, Nico, Tara, Thomas et Xiao, ces sorties footing ont tellement jouées sur mon moral et ont rendus mes midis/soirées tellement plus fun (malgré les courbatures)! Merci aussi à tous les adversaires/partenaires de badminton pour avoir rythmé les pauses midis à Valrose.

Je remercie plus particulièrement les « super sportifs » du mardi soir Aurélien, Ben, Manon et Simon avec qui l'après-sport autour d'un café, d'un verre ou d'un repas se faisait toujours avec enjouement.

Mais aller au bout de ces trois années et les rendre si mémorables, n'aurait pas été possible sans certaines personnes. Tout d'abord, je ne saurais comment remercier Ben(ji) et Laurane. Merci Ben pour ton aide en tant que bricoleur, ton soutien moral, ton humour anglais, tes talents culinaires, ou encore tes cours de langue française. Un grand merci à toi Laurane pour les longs moments « ragots » et les fous rires au bureau ou au téléphone, les nombreux et précieux conseils, les ballades pour s'aérer l'esprit et les « pedibus » matinaux qui faisaient bien commencer les journées. Merci beaucoup à vous deux pour les (petites) soirées décompressages inoubliables ! Je n'oublie pas non plus Flo avec qui les soirées Risk, koh lanta, fléchettes au paddy's (et j'en passe) ont été au top. Vous avez su être là quand il fallait, à tout moment... et à n'importe quelle heure. Merci simplement d'être vous.

Une mention spéciale à tout le « groupe indispensable » qui a été ma 2^e famille à Nice : Charlotte et Anna (pour les heures à parler de tout au bureau, pendant les pauses goûters ou au sport... le bodybarre ça rapproche), les Modmol Princess Jojo et Yaya (pour avoir toujours prêté une oreille attentive à mes folles histoires et me prêter des ordinateurs surpuissants), Simon (mon « joyeux drille » de soirée, partenaire de salsa et confident de pause-café irremplaçable), Marie (pour ta présence et ton soutien « hors ICN » qui m'ont fait tellement de bien), Émilie PEF ou frisouillette (pour avoir le meilleur prénom du monde -hahaha- et surtout pour toutes nos discussions nécessaires pour se remonter le moral), et Johnny (and Ceci) for the lovely people you are!

Avec vous, j'ai probablement vécu les meilleures soirées à thèmes de toute ma vie. Merci à vous tous pour votre bonne humeur au quotidien et votre soutien sans faille ! Vous avez toujours été là, pour discuter thèse (ou autre), me dépanner, ou juste pour rigoler un bon coup.

~

Et puis, la thèse ne se limite pas aux murs du labo !

Remerciement un peu particulier mais tout de même merci au BD de Libé qui m'a fait découvrir de bonnes bières et passer de bons moments ! Merci Aurélien pour avoir été un barman génial et merci la team « Ve Bu Gdi bières » pour votre sympathie !

Et comment ne pas parler de la compagnie Vis de Forme ! Énorme merci à Antoine, Benoît, tata Claire, Daniele, Edwige, Jas', John, Lorenzo, Marie-Hélène, Nathan, Nico, Renaud, Tatiana et tous les autres comédiens ! Vous avez contribué à me faire passer des moments de rire comme ce n'est pas permis et des soirées St Riquier/pétanque plus folles les unes que les autres ! Merci à Élisabeth Piron de m'avoir permis de remonter sur les planches et retrouver cette passion pour le théâtre qui m'avait tant manqué ! Vous me direz « ça ne veut rien dire hein ! » mais là quand même... je vous aime tous !!

Je termine ces remerciements par citer ceux qui sont et seront toujours là pour moi dans tout ce que j'entreprends malgré la distance.

Merci à mes amis de toujours éparpillés partout en France (ou ailleurs) : Anne-c, Alizée, Ariane, Chacha, Clarisse, Damdam, Delphine, Élo (merci de m'avoir fait l'honneur d'avoir pu réaliser ma première conf invitée !!), Élodie, Esther, Julie Jolie, Kévin (ou Thibaut), Lionel, Marion, Mika, Morgane, Saretta, Tild-ma et Loïc pour toutes ces années à me supporter.

Mes derniers mots vont à ma famille. Merci maman et papa pour avoir survécu à mes sautes d'humeurs durant ces trois années. J'ai de la chance de vous avoir, et pas seulement pour les bons plats alsaciens. Vous avez toujours été présents quand il fallait (ou du moins quand vous ne loupiez pas votre avion). Merci mes chers « petits » frères pour avoir fait l'animation musicale à la maison (un peu trop forte quelquefois) et la vaisselle à ma place lorsque j'étais en rédaction. Grand merci à mamama et papapa, à mamie et papi, à Rose, mon rayon de soleil de filleule, à Amandine pour sa gentillesse et son hospitalité quand je « m'invitais » à Strasbourg, à Joanna pour son soutien à distance, bref merci à ma famille alsacienne qui aimait toujours avoir de mes nouvelles niçoises.

Pour finir, même si j'ai du mal à conclure... « Hopla, merci vielmols » à tous !

Table des matières

Liste des figures	1
Liste des tableaux	7
Glossaire	9
Abréviations	11
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE I.	19
I. LAVANDE, LAVANDIN ET COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS (COVS)	19
I.1. LAVANDE ET LAVANDIN, DEUX CULTURES EMBLEMATIQUES DE LA PROVENCE	20
I.1.1. CLASSIFICATION TAXONOMIQUE	20
I.1.3. CULTURES DE LAVANDES ET LAVANDINS EN PROVENCE	22
I.2. LE DECLIN DES LAVANDERAIES EN FRANCE	23
I.2.1. FACTEURS MENAÇANT LES LAVANDES	23
I.2.1.1. Ravageurs	23
I.2.1.2. Maladies fongiques	24
I.2.1.3. Les phytoplasmes	25
I.2.1.4. Bilan	26
I.2.2. CYCLE DE VIE DE LA CICADELLE ET TRANSMISSION DU PHYTOPLASME	27
I.2.3. SENSIBILITE/TOLERANCE DES PLANTS DE LAVANDE ET LAVANDIN	30
I.2.4. PROPOSITIONS DE LUTTES	31
I.2.4.1. Actions préventives	31
I.2.4.2. Idées de luttes alternatives	32
I.3. ROLES DES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS (COVS) DANS LES INTERACTIONS ENTI	RE LES
ORGANISMES VIVANTS	34
I.3.1. DEFINITION ET PROPRIETES DES COVS	34
I.3.2. ROLES DES COVS DANS LES PLANTES	34
I.4. DIVERSITE CHIMIQUE DES COMPOSES VOLATILS EMIS ET STOCKES PAR LA LAVANDE	37
I.4.1. COMPOSES TERPENIQUES	37
I.4.1.1. Définitions	37
I.4.1.2. Biosynthèse	38
I.4.1.3. Monoterpènes et monoterpénoïdes	39
I.4.1.4. Sesquiterpenes et sesquiterpénoïdes	42
I.4.2. GREEN LEAF VOLATILES	42
I.4.4. Stereochimie des molecules volatiles	43
I.4.4.1. Configuration Z/E	43
I.4.4.2. Configuration R/S	43

I.5. É TUDE METABOLOMIQUE DES COV S EN ECOLOGIE	45
I.5.1. DEFINITION DE LA METABOLOMIQUE	45
I.6. EXTRACTION DES COVS	48
I.6.1. EXTRACTION DES COVS STOCKES	48
I.6.2. PIEGEAGE DES COVS EMIS	50
I.6.2.1. Méthodes passives	51
I.6.2.2. Méthodes dynamiques	55
I.6.2.3. Bilan	59
I.7. METHODES ANALYTIQUES POUR ETUDIER LES COVS	60
I.7.1. INJECTEUR	60
I.7.2. COLONNES	61
I.7.3. DETECTEURS	62
1.7.4. NOUVELLES METHODES DE DETECTION DIRECTE DE GAZ	63
I.8. TRAITEMENT DES DONNEES	65
I.8.1. Pretraitement des donnees [178]	65
I.8.2. ANALYSES STATISTIQUES	68
I.8.2.1. Analyses univariées	68
I.8.2.2. Analyses multivariées [178]	68
I.9. IDENTIFICATIONS DES COVS ET ESSAIS BIOLOGIQUES	70
I.9.1. ÉTAPES D'IDENTIFICATION [168]	70
1.9.2. Essais biologiques et validation	71
OBJECTIFS DE LA THESE	73
CHAPITRE II.	75
II. ÉTUDE DES COMPOSES ORGANIQUES VOLATILS (COVS) EMIS PAR LES RACINES DE LAVAN	DE ET
LAVANDIN	75
	70
II.1. INTERETS D'ETUDIER LES COVS EMIS PAR LES RACINES	70
II.1.1. PROBLEMATIQUE	/6
II.1.2. PIEGEAGE DES COVS RACINAIRES, UN DEFI	//
II.2. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE HS-SPME GC-MS POUR ETUDIER LES COVS	EMIS
PAR LES RACINES DE LAVANDE ET LAVANDIN EN LABORATOIRE	81
II.3. DIFFERENCE DE SIGNATURES CHIMIQUES ENTRE VARIETES SENSIBLES ET TOLERANTES	101
II.4. PERSPECTIVES	105
II.4.2. CONCEPTION ET EVALUATION DE L'EFFICACITE D'UN DISPOSITIF DE HS-SPME APPLICABLE SUR LE TERRAL	N (EN
SERRE OU EN PLEIN CHAMP)	108

II.4.3. снамр)	ESSAIS D'EXTRACTIONS EN ESPACE DE TETE DYNAMIQUE APPLICABLES SUR LE TERRAIN (EN SERRE 112	OU EN PLEIN
II.5. C	ONCLUSION	115
Снарг	TRE III.	117
<u>III.</u> É1	<u>IUDE DE LA VARIABILITE CHIMIQUE DES COVS EMIS PAR LES PARTIES AERIENNES</u> DE ET LAVANDIN EN PLEIN CHAMP	<u>, DE</u> 117
III.1. F	PROBLEMATIQUE	118
III.1.1.	ÉTABLISSEMENT D'UN CAHIER DES CHARGES DETAILLANT LES CONTRAINTES DE PIEGEAGE DES CO	OVS SUR LE
TERRAIN	119	
III.1.2.	CONCEPTION D'UN DISPOSITIF D'EXTRACTION DHS SIX VOIES APPLICABLE SUR LE TERRAIN	120
III.2. É	ÉTUDE METABOLOMIQUE 2017 SUR LES COV S DE LAVANDE ET LAVANDIN CUL	TIVES EN
PLEIN C	СНАМР	123
III.2.1.	Approche metabolomique developpee en 2017	123
III.2.2.	BILAN DE L'ETUDE REALISEE EN 2017	143
III.3. F	RESULTATS DE L'ETUDE METABOLOMIQUE 2018	143
III.3.1. 2018	CARACTERISATION CHIMIQUE DES COV EMIS PAR DIFFERENTES VARIETES DE LAVANDE FINE ET L 144	AVANDIN EN
III.3.2.	DIFFERENCES DE SIGNATURES CHIMIQUES ENTRE PLANTS ASYMPTOMATIQUES ET SYMPTOMATIC	LUES DE
QUATRE	VARIETES EN 2018	147
III.3.2.1	L. Étude sur les lavandes	147
111.3.2.2	2. Etude sur les lavandins	148
III.3.2.3	Hypotheses des repartitions non distinctes entre les plants asymptomatiques e matiques	et 140
sympto III 2 2	Évolution des variariutes chimiques entre 2017 et 2018	148
III.3.3.1	Lavande fine 7713	149
111.3.3.2	2. Lavandin <i>abrial</i>	149
III.3.3.3	B. Bilan	151
III.3.4.	MODIFICATION DU BOUQUET DE COVS EN FONCTION DE L'INFECTION DES PLANTES PAR LE PHY	TOPLASME 151
111.4. 0	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	153
Снарі	TRE IV.	155
IV. ÉI	IUDE METABOLOMIQUE SUR LES COVS STOCKES PAR LES FEUILLES ET INFLORESC	ENCES DE
LAVAN	DE ET LAVANDIN	155
IV.1.0	Contexte et design experimental	156

IV.1.2.PROBLEMATIQUE157IV.1.4.PREPARATION DE L'ECHANTILLON158IV.1.4.1.Séchage158

IV.1.4.2	2. Broyage	158
IV.1.4.3. Extraction solide-liquide assistée aux ultrasons		
IV.1.5.	SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE	160
IV.1.6.	TRAITEMENT DES DONNEES	162
IV.2. [Developpement d'une etude metabolomique sur les COVs stockes d	OANS LES
PLANTS	S ASYMPTOMATIQUES ET SYMPTOMATIQUES	163
IV.3. [DIFFERENCES DE COMPOSITIONS CHIMIQUES EN FONCTION DE L'ETAT SAIN O	U INFECTE DES
PLANTS	5, DETERMINE PAR ANALYSES Q PCR	186
IV.3.1.	ÉTUDE SUR LA LAVANDE 7713	186
IV.3.2.	ÉTUDE SUR LE LAVANDIN <i>ABRIAL</i>	186
IV.3.3.	INFLUENCE DU PHYTOPLASME SUR LA COMPOSITION EN COVS STOCKES	187
IV.4. E	BILAN ET PERSPECTIVES SUR LES COVS STOCKES	188
IV.4.1.	ÉTUDE EN FONCTION DES ANNEES	188
IV.4.2.	ÉTUDE DES ISOMERES CARACTERISTIQUES : LINALOL, ACETATE DE LINALYLE ET FARNESENE	188
IV.5. 0	Comparaison des COVs emis et stockes en 2017	191
IV.5.1.	COVs EMIS VS. COVS STOCKES	191
IV.5.2.	LAVANDE FINE 7713 VS. LAVANDIN ABRIAL	193
IV.5.3.	PERCEPTION DES COMPOSES PAR LA CICADELLE	193
Снаріт	rre V.	195
<u>V. AP</u>	PORT D'UN SYSTEME DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A	
<u>SPECTR</u>	OMETRIE DE MASSE PORTABLE	195
V 1 C	ΟΝΤΕΧΤΕ	196
V 1 1		196
V.1.1. V.1.2.	APPAREILS PORTABLES ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	198
V.2. A	PPORT D'UN APPAREIL DE GC-MS PORTABLE DANS L'ANALYSE DES COV S D	E LAVANDE ET
LAVAN	DIN	202
CONCI	USION /PERSPECTIVES	215
Ráfárar	Souces Sidny February 2	
Comm	Communications ácrites et orales	
Annexes 24		245
		245

Liste des figures

Figure I-1. Classification taxonomique des espèces du genre Lavandula (d'après [5])20
Figure I-2. Morphologie des deux espèces étudiées : lavande fine (A) et le lavandin (B)
(schémas d'après [9])
Figure I-3. Distribution géographique des zones de production de lavande et lavandin et
emplacement des distilleries (modifiée d'après [13])
Figure I-4. Photos de ravageurs attaquant les lavandes (Photos CRIEPPAM) : (A) bave de
cercope des prés ; (B) cochenille sur épis de lavandin ; (C) chenille tordeuse ; (D) larve de
noctuelle sur lavande ; (E) punaise de lavandin ; (F) cicadelle
Figure I-5. Photo de bactéries pathogènes au sein du phloème au microscope électronique
(modifiée d'après [17])25
Figure I-6. Cycle de vie de Hyalesthes obsoletus et transmission de la maladie du
dépérissement sur la lavande (d'après cycle établi par l'ITEIPMAI : Institut technique des
plantes à parfum, médicinales, aromatiques et industrielles). Photos de l'insecte en train de
se nourrir sur du lavandin et œufs de <i>H. obsoletus</i> (Photos CRIEPPAM, ITEIPMAI)27
Figure I-7. Détection par qPCR du phytoplasme présent dans les variétés de lavande fine (LA)
ou de lavandin (LIN) en fonction des mois (D : Décembre, M : Mai, J : Juin, J : Juillet, S :
Septembre, O: Octobre, N: Novembre) et des emplacements de champs indiqués entre
parenthèses. N correspond au nombre d'échantillons testés (figure extraite de [19])29
Figure I-8. Actions préventives réalisées pour lutter contre le dépérissement : « filière de
plants sains » (A), couverts végétaux à droite (B) (Photos CRIEPPAM)
Figure I-9. Différents rôles écologiques des COVs (modifiée d'après [42])
Figure I-10. Voies de biosynthèse des terpènes (d'après [4])
Figure I-11. Exemples de structures de mono- et sesquiterpènes détectés dans le genre
Lavandula. (1) linalol, (2) acétate de linalyle, (3) camphre, (4) 1,8-cineole, (5) limonène, (6)
lavandulol, (7) acétate de lavandulyle, (8) β-caryophyllène40
Figure I-12. Structures de (1) l'acétate d'hexyle et du (2) (Z)-3-hexen-1-ol
Figure I-13. Structures chimiques de (1) la coumarine et (2) la 7-méthoxycoumarine
Figure I-14. Place de la métabolomique dans les techniques en « -omiques »
Figure I-15. Etapes de la stratégie d'étude employée48
Figure I-16. Sac d'échantillonnage en Tedlar [®] et pompe de prélèvement
Figure I-17. Extraction par SPME : 1, Extraction sur plante ; 2, Dispositif
Figure I-18. Extraction par sorption sur barreau magnétique : 1, Extraction sur plante ; 2,
Schémas des barreaux53
Figure I-19. Extraction par DHS : 1, Piège ; 2, Piège et pompe55
Figure I-20. Système « SnifProbe » (Reproduction avec l'autorisation de la société Aviv
Analytical)
Figure I-21. Méthodes de piégeage des COVs les plus couramment utilisées. Les chiffres
représentent le nombre de publications trouvées après recherche sur « SciFinder » en entrant
les termes : "volatil" et "plant" accompagnés de la méthode d'extraction
Figure I-22. Représentation simplifiée d'un chromatographe

Figure I-23. Photo d'un ATD-GC-MS. (A) : thermodésorbeur, (B) : chromatographe en phase gazeuse (séparateur), (C) : spectromètre de masse (détecteur)
Figure I-24. Représentation simplifiée d'un chromatographe couplé à l'électro- antennographie (GC-EAD) et à un détecteur FID63
Figure I-25. Schéma du dispositif PTR-MS (d'après [175]) (A) et exemple du spectre de masse du β -caryophyllène obtenu (extrait de [176]) (B)
Figure I-27. Schéma des principales analyses univariées
à n carbone, selon Van den Dool et Kratz
Figure I-30. Exemples de dispositifs permettant de réaliser des tests comportementaux à l'aide
d'olfactomètre dynamique possédant 4 champs d'odeur ★ (A), d'olfactomètre statique (B), ou d'olfactomètre de type tunnel (C) (modifiés d'après respectivement [192], [193] et [194]). 72
Figure II-1. Log-abundance of coumarin, thymol, cuparene and fenchol compounds detected by HS-SPME GC-MS (30 min, CAR/PDMS fiber), as a function of the temperature of extraction of the ground roots of <i>L. x intermedia</i> . Standard deviations are represented and calculated from a triplicate analysis
Figure II-2. Log-abundance of coumarin, thymol, cuparene and fenchol compounds detected by HS-SPME GC-MS (70°C, CAR/PDMS fiber), as a function of time for the extraction of the ground roots of <i>L. x intermedia</i> . Standard deviations are represented and calculated from a triplicate analysis
SPME coating on chromatographic profiles of compounds detected by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C) on the ground roots of <i>L. x intermedia</i>
compounds (\pm SD) above the bars. (b) The effects on the extraction of fenchol, coumarin, thymol and cuparene detected by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C) on the ground roots of <i>L. x intermedia</i> . Standard deviations are represented and calculated from a triplicate analysis87
Figure II-5. Chromatograms of compounds detected by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C, DVB/CAR/PDMS fiber) on the intact roots of <i>L. x intermedia</i> . The numbers correspond to the compounds detailed on Table II-2 and Annexe 2
varieties. The inter-variance explained by the two components is 55%
Figure II-7. The top 15 most significant metabolites that discriminate four varieties of fine
Iavender and Iavandin roots. Significant metabolites were selected based on VariableImportance in Projection (VIP) score of a PLS-DA model.96
Figure II-8. Analyse discriminante (PLS-DA) sur les composés émis par les racines intactes de variétés tolérantes (MAIL : <i>maillette</i> ; DIVA ; GROSSO ; SUP : <i>supian</i>) ou sensibles (ABR : <i>shrigh</i> ; 7712) de lavande fine et de lavandin
<i>ubilui , / / 13 jue lavallue lille et ue lavallulli</i>

Figure II-9. Changements dans l'abondance relative des 25 composés discriminants présentés dans le Tableau II-4 en fonction du statut sensible (rouge) et tolérant (vert) (Mann & Whitney, test non-paramétrique - *p < 0,05)......104 Figure II-10. Chromatogrammes des composés détectés par HS-SPME GC-MS (60 min à 70°C, fibre DVB/CAR/PDMS) sur les parties racinaires de lavandin grosso asymptomatique (noir) et symptomatique (orange). Les numéros font références aux COVs cités dans le Tableau II-5. Figure II-11. Schéma du dispositif de HS-SPME développé pour étudier les COVs émis par les Figure II-12. Optimisation de la durée d'extraction de la fenchone (bleu), du fenchol (rouge) et du 1,8-cinéole (rose) détectés par HS-SPME GC-MS sur les racines de lavandin grosso en pot Figure II-13. Chromatogrammes des composés détectés par HS-SPME GC-MS (fibre DVB/CAR/PDMS) sur des racines intactes de lavandin grosso après extraction de 60 min à 70°C en laboratoire (A), ou après 4 h d'extraction dans la terre seule (noir) ou avec racines (vert) Figure II-14. Schéma du dispositif d'extraction en espace de tête dynamique réalisé sur un plant de lavandin grosso (pompe Tecora, tube Tenax) (A) et photo de son application (B). 113 Figure II-15. Schéma d'une proposition de dispositif d'extraction en espace de tête dynamique Figure III-1. Photo du dispositif d'échantillonnage utilisé en champ et mis en place au sein de l'ICN (A) ainsi que son schéma (B).....122 Figure III-2. Evolution of the symptoms of yellow decline on lavender under cultivation. Infection is rated in four stages: (1), plants without symptoms; (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes; (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves; (4), Figure III-3. View and GPS position of the 7713 fine lavender (A) and abrial lavandin (B) field in Monieux (France). Red points indicate where VOCs collection have been carried out. ... 127 Figure III-4. The overlay total ion chromatograms (TICs) of compounds detected by DHS ATD-GC-MS analysis on aerial parts of 7713 fine lavender. The green and broken red lines respectively indicated a sample from asymptomatic and symptomatic profile. The numbers Figure III-5. Partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA) score plot of compounds emitted by 7713 fine lavender aerial part depending on plant levels of infection. (1), plants without symptoms (green); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves Figure III-6. Changes in the relative abundance of the main discriminant compounds according to their VIP score (VIP score > 0.9) derived from PLS-DA on 7713 fine lavender aerial part and depending on plant levels of infection. (1): plants without symptoms (green); (3): plants having almost no floral stems, but with some leaves (red) (Mann & Whitney non-parametric test - *p Figure III-7. PLS-DA score plots of compounds emitted by *abrial* lavandin aerial part depending on asymptomatic and symptomatic plants (A) or on plant levels of infection (B, C, D). (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3), Figure III-8. Changes in the relative abundance of the main discriminant compounds according to their VIP score (VIP score > 0.9) derived from PLS-DA on abrial lavandin aerial part and depending on plant levels of infection. (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red)......140 Figure III-9. Graphique des individus (A) et des variables (B) des composés émis par les parties aériennes de la lavande fine maillette en 2018 suivant leur contribution au modèle.......... 147 Figure III-10. PLS-DA sur les composés émis par les variétés maillette (A), 7713 (B), abrial (C) et grosso (D) suivant les niveaux d'infection. (1), plantes sans symptômes (vertes), (2), plantes légèrement jaunissantes, avec moins de hampes florales (orange), (3), plantes n'ayant presque Figure III-11. Abondances relatives de composés discriminants émis en 2018 par les parties aériennes de lavande fine 7713 (A) ou de lavandin abrial (B) en fonction des niveaux d'infection des plantes. (1), plantes sans symptômes (vertes) ; (3), plantes n'ayant presque pas de tiges florales, mais avec quelques feuilles (rouges)......150 Figure III-12. PLS-DA sur les composés émis par le lavandin abrial suivant les états sains (noir)/infectés (rouge) des plants en 2017 (A) et 2018 (C) et abondances relatives de certains composés émis en 2017 (B) et 2018 (D) en fonction des états sains (vert)/infectés (rouge). Figure IV-2. Photo du broyeur MM 301 (Retsch GmbH & Co, Haan, Allemagne)158 Figure IV-3. Phénomène de cavitation (d'après [273]).....159 Figure IV-4. Chromatogrammes des composés détectés par GC-MS, séparation sur colonne DB-5HT (A) et HP-1 (B) dans des extraits hexaniques de feuilles de lavandin grosso. 161 Figure IV-5. Exemple d'une série d'analyses (inflorescences ou feuilles séparées d'une variété) répartie en trois séquences......162 Figure IV-6. Illustration of yellow decline on lavender under cultivation. Infection rate can be separated in four levels: (1), plants without symptoms; (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes; (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves; (4), dead Figure IV-7. Experimental design implemented in the study of stored VOCs of lavender and Figure IV-8. Chromatographic profiles (A) and PCA score plots (B) of compounds emitted by Figure IV-9. Evolution of the abundance of the internal standard during the analytical sequence of asymptomatic (asympto), symptomatic (symptom) leaves or pools from 7713 Figure IV-10. The overlay total ion chromatograms (TICs) of compounds detected by UAE GC-MS analysis on 7713 fine lavender extracts from symptomatic/asymptomatic inflorescences (a/b) or leaves (c/d)......174

Figure IV-11. PLS-DA plots of stored VOCs from 7713 fine lavender inflorescences depending on plant levels of infection: asymptomatic or symptomatic plants. (A), plants without symptoms (green); (S), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red). . 179 Figure IV-12. Changes in the relative abundance of the identified discriminant compounds after normalisation with the abundance of the internal standard, according to their VIP score (VIP score>0.9) derived from PLS-DA on 7713 fine lavender inflorescences and depending on plant levels of infection. (1), plants without symptoms (green); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red) (Mann & Whitney non-parametric test - *p < 0.05; Figure IV-13. PLS-DA score plots of stored VOCs from abrial lavandin inflorescences depending on asymptomatic and symptomatic plants (A) or on plant levels of infection (B, C, D). (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3) Figure IV-14. Changes in the relative abundance of the identified discriminant compounds after normalisation with the abundance of the internal standard, according to their VIP score (VIP score>1.5) derived from PLS-DA on abrial lavandin inflorescences and depending on plant levels 1-2 (A) or 1-2-3 (B) of infection. (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red) (Mann & Whitney non-parametric test - *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Figure IV-15. PLS-DA sur les composés stockés dans les inflorescences de lavandin abrial suivant les états sains (noir)/infectés (rouge) des plants (A) et abondances des composés discriminants en fonction des états sain (vert)/infecté (rouge) (B) (test non paramétrique de Figure IV-16. Chromatogramme des composés détectés par GC-FID (colonne chirale Lipodex E) dans les extraits hexaniques de fleurs de lavandin abrial symptomatique ou Figure V-1. Méthodes permettant de diagnostiquer de façon non destructive une plante infectée par un pathogène en étudiant le bouquet de COVs (figure extraite de [295]). CLSA: closed-loop-stripping-analysis, système d'extraction dynamique en circuit fermé qui consiste à piéger les COVs entraînés par un gaz inerte sur un piège adsorbant. MCC: Multi-capillary-Figure V-2. Schématisation du système de chromatographie en phase gazeuse portable (ppGC-Figure V-3. Application in the MIP's Gardens (Mouans-Sartoux, France) by needle trap extraction on lavender (A), and a view of the Torion T-9 GC/MS in lavender fields (B)...... 204 Figure V-4. The total ion chromatogram (TIC) of compounds detected by NT-ppGC-ITMS analysis on above-ground parts of diva fine lavender. The numbers correspond to the Figure V-5. Chemical structures of the thirty compounds detected by NT-ppGC-ITMS in three minutes of analysis on above-ground parts of *diva* fine lavender and *grosso-ADA* lavandin. The Figure V-6. Partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA) score plot of compounds

Liste des tableaux

Tableau I-1. Classification du genre Lavandula selon la classification APG (Angiosperm Phylogeny Group) [2] 20
Tableau I-2 Exemples de modifications phytochimiques dans les HE obtenues à partir de
plantes aromatiques et médicinales saines ou infectées par le phytoplasme (C, phytoplasma
sp.) (d'après [16])
Tableau I-3. Notation des symptômes du dépérissement de la lavande et du lavandin (d'après
des données internes, CRIEPPAM)
Tableau I-4. Principaux COVs identifiés après (hydro-)distillation ou extractions en espace de
tête ^[a] à partir d'inflorescences et de feuilles du genre Lavandula (sous-genre Lavandula) 41
Tableau I-5. Distribution énantiomérique dans les HE de six lavandes (sous-genre Lavandula).
Tableau I-6. Exemples d'études métabolomiques développées pour l'étude des COVs
impliqués dans des problématiques écologiques47
Tableau I-7. Procédés d'extractions des composés volatils émis et stockés de lavande 49
Tableau I-8. Techniques passives d'extraction de COVs.52
Tableau I-9. Techniques dynamiques d'extraction de COVs. 56
Tableau I-10 : Principaux logiciels pour réaliser le traitement des données de GC-MS en
écologie chimique
Tableau II-1. Synthèse et schéma des dispositifs employés en espace de tête pour piéger les
COVs émis par les racines dans le sol
Table II-2.VOCs identified by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C, DVB/CAR/PDMS fiber) from
grosso L. x intermedia roots
Table II-3. The characteristics of the fifteen most significant metabolites emitted by intact
Tablace II 4, Los 25, métabolitos los plus cignificatifs permettant de départages des regines
rableau II-4. Les 25 metabolites les plus significatifs permettant de departager des racines
Tableau II.5. Pourcontages relatifs des COVs identifiés par HS-SPME CC-MS sur des racines de
$\frac{1}{1}$
Tableau II-6 COVs identifiés nar HS-SPME GC-MS/FID (4h fibre DVB/CAR/PDMS) sur les
racines de L. x intermedia variété arosso en pot
Tableau II-7. Exemple de plan d'expérience de 5 facteurs à 4 niveaux (d'après la méthode
Taguchi)
Table III-1. Relative percentages of 7713 fine lavender and <i>abrial</i> lavandin VOCs trapped on
asymptomatic and symptomatic plants in fields and identified by ATD-GC-MS
Table III-2. VIP score of the top discriminant compounds in 7713 fine lavender plants. On the
right, the result of the test of significance between asymptomatic (level 1) and symptomatic
(level 3) plants (Mann & Whitney non-parametric test - *p < 0.05)
Table III-3. Identity and associated <i>p</i> -value of the significant metabolites that discriminate
abrial lavandin plants depending on asymptomatic (level 1) to symptomatic (level 2) stages.

Tableau III-4. Pourcentages relatifs des COVs piégés en 2018, en champ, sur des lavandes et lavandins asymptomatiques (A) et symptomatiques (S) et identifiés par ATD-GC-MS....... 145 Table IV-1. Coefficients of variation (CV) of retention times and abundances of thirteen Table IV-2. Relative percentages of stored VOCs from symptomatic and symptomatic 7713 fine Tableau IV-3. Composés discriminants présentant des différences d'abondances significatives (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001) ou non entre les plants asymptomatiques et les plants symptomatiques en 2017. Les marqueurs ont été identifiés à partir de l'étude sur les COVs émis en champ (E : émissions) ou sur les COVs stockés (I : inflorescences, F : feuilles) (+ : composé plus abondant ; [a]identifié en tant que marqueur Tableau V-1. Avantages et inconvénients de différents dispositifs de GC-MS portables Table V-2. VOCs identified by DHS-NT GC-MS (5 min) in diva and grosso-ADA above-ground

Glossaire

Allomone : substance allélochimique bénéfique pour l'organisme émetteur.

Bractée : Feuille située à la base d'un pédoncule (organe végétatif reliant la fleur ou l'inflorescnce à la tige).

Calice : ensemble de pièces florales le plus souvent vertes (sépales) partant d'un même niveau sur un même axe, et assurant la protection des autres pièces florales dans le bouton floral.

Cicadelle : insecte hémiptéroïde de la famille des *Cixiidae*.

Corolle : ensemble des pétales d'une fleur.

Hémiptéroïde : ordre d'insectes munis de quatre ailes et aux pièces buccales piqueuses et suceuses.

Huile essentielle : extrait obtenu par hydro-distillation, distillation à la vapeur d'eau, distillation sèche ou expression.

Inflorescence : disposition des fleurs sur la tige d'une plante.

Kairomone : substance allélochimique bénéfique pour l'organisme récepteur.

Métabolomique : analyse de l'ensemble des métabolites d'un système vivant.

Métabolite : molécules de faibles masses moléculaires (< 1500 Dalton) participant au fonctionnement de la cellule.

Mycorhization : symbiose entre champignons et racines des plantes.

Nymphe : dernière forme larvaire, active, des insectes.

Origine abiotique : physique ou chimique, non lié aux êtres vivants.

Origine biotique : lié à l'activité des êtres vivants.

Phéromone : substance sémiochimique, qui, émise à dose infime par un animal dans le milieu extérieur, provoque chez un congénère des réactions comportementales spécifiques (interactions intraspécifiques).

Phytoplasme : bactéries procaryotes pathogènes sans paroi cellulaire, classés parmi les Mollicutes (bactéries parasites de 0,3 à 0,8 μm).

Psylle : insecte hémiptéroïde.

Substance allélochimique : substance sémiochimique impliquée dans les interactions interspécifiques.

Substance sémiochimique : substance produite dans l'air, l'eau ou le sol par un être vivant (émetteur, qui peut être une plante, un animal, un champignon ou une colonie bactérienne), libérée dans l'environnement, qui déclenche une réponse comportementale chez un organisme récepteur.

Stylet : pièce buccale piqueuse en forme de soie rigide.

Synomone : substance allélochimique bénéfique pour l'organisme émetteur et récepteur.

Abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales (PCA: Principal Component Analysis)
ANOVA	Analyse de variance (ANalysis Of VAriance)
APG	Groupe de botanistes qui travaillent sur la phylogénétique végétale
	(Angiosperm Phylogeny Group)
ASE	Extraction par solvant accélérée (Accelerated Solvent Extraction)
ATD	Unité de désorption thermique automatisée (Automated Thermal Desorption)
CASDAR	Compte d'Affectation Spéciale « Développement Agricole et Rural »
CAR	Carboxen
CEFE	Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
clr	transformation logarithmique centrée (centered log-ratio)
CLSA	Extraction par entraînement dans une boucle fermée (Closed-Loop-Stripping-
	Analysis)
CNPMAI	Conservatoire national des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et
	industrielles
COVs	Composés organiques volatils
CRIEPPAM	Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum
	Aromatiques et Médicinales
CV	Coefficient de variation
DC-STE	Extraction par contact direct sur bande absorbante (Direct Contact-Sorptive
	Tape Extraction)
DHS	Espace de tête dynamique (Dynamic Headspace)
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
DMNT	(3E)-4,8-diméthyl-1,3,7-nonatriène
DMS	Spectromètre de mobilité différentielle (Differential Mobility Spectrometry)
DVB	Divinylbenzene
EAD	Détecteur électroantennographique (Electroantennography Detector)
ECD	Détecteur à capture d'électrons (Electron Capture Detector)
EI	Ionisation électronique (Electronic Ionization)
FPP	Farnésyl-pyrophosphate
FID	Détecteur à Ionisation de Flamme (Flame Ionization Detector)
FWHM	Largeur du pic à mi-hauteur (Full Width at Half Maximum)
GC	Chromatographie en phase gazeuse (Gas chromatography)
GC-O	GC couplée à un olfactomètre (Gas Chromatography-Olfactometry)
GLVs	Substances volatiles végétales composées de six carbones (Green Leaf
	Volatiles)
GNIS	Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants
GPP	Géranyle diphosphate
ha	hectare
HD	Hydrodistillation
HE	Huile(s) essentielle(s)
HIPVs	Molécules volatiles qu'une plante produit en réponse à l'attaque d'herbivores
	(Herbivore-Induced Plant Volatiles)

HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution (High Resolution Mass Spectrometry)
HS	Espace de tête (Headspace)
HSSE (ou HSE)	Extraction par Sorption en Espace de tête (Headspace Sorptive Extraction)
ICN	Institut de Chimie de Nice
IMBE	Institut méditerranéen de biodiversité et d'écologie
INCAT	Adsorption à l'intérieur de l'aiguille creuse contenant une colonne capillaire ou
	un revêtement de carbone (Inside Needle Capillary Adsorption Trap)
INDEx	Extraction dynamique dans une aiguille (Inside Needle Dynamic Extraction)
IPP	Isopentenyl diphosphate
IR	Indice de rétention (LRI : Linear Retention Indices)
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transform InfraRed
	spectroscopy)
ITEIPMAI	Institut technique des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et
	industrielles
ITEX	Extraction en tube (In-tube extraction)
LBVpam	Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques
	et médicinales
MCC	Colonne multicapillaire (Multi-capillary-column)
MMSE	Extraction par sorption sur matériau monolithique (Monolithic Material
	Sorption Extraction)
MS	Spectromètre de masse (Mass spectrometry)
MW	Masse moléculaire (Molecular Weight)
m/z	Rapport masse/charge (mass/charge number)
NMC	Pourcentage d'erreur de classification (Number of MisClassifications)
NO	Oxyde nitrique
NPD	Détecteur azote-phosphore (Nitrogen–Phosphorus Detector)
NT	Extraction sur aiguille (Needle Trap)
PA	Polyacrylate
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEG	Polyethylène glycol
PET	Poly(téréphtalate d'éthylène)
PFPD	Détecteur à photométrie de flamme pulsée (Pulsed Flame Photometric
	Detector)
PLOT	Colonnes poreuses (Porous Layer Open Tubular)
PLS-DA	Régression partielle des moindres carrés en analyse discriminante (Partial Least
	Square-Discriminant Analysis)
PPLS-DA	Powered PLS-DA
PPAM	Plantes a Parfum, Aromatiques et Medicinales
ppGC-ITMS	Système de chromatographie en phase gazeuse portable, couple a un petit
	spectrometre de masse de type piege a ions toroidal (person-portable GC
DTEE	system coupled with a miniature toroidal ion trap mass spectrometer (ITMS))
	Polytetratiuoroetnylene
r i k-IVI2	Spectrometrie de masse par reaction de transfert de protons (Proton-Transfer-
	Reaction Mass Spectrometry)
RIN .	injecteur a temperature controlee (Programmed Temperature Vaporization)

qPCR	Réaction quantitative en chaîne par polymérase (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire (NMR: Nuclear Magnetic Resonance)
rpm	tour par minute (revolutions per minute)
SBSE	Extraction par Sorption sur Bareau Magnétique (Stir Bar Sorptive Extraction)
SD	Déviation standard (Standard deviation)
SDME	Microextraction sur goutte de solvant (Single Drop Micro Extraction)
SIM	Mode de détection d'ions spécifiques (Single Ion Monitoring)
SPDE	Extraction dynamique en phase solide (Solid-Phase Dynamic Extraction)
SPME	Microextraction sur phase solide (Solid Phase Microextraction)
ST	Tubes de silicone (silicone tubing)
std	standard
TIC	Courant ionique total (Total Ion Chromatogram)
TR	Temps de rétention (RT: Retention Time)
tr.	Composés à l'état de traces, pourcentage relatif < 0,1 % (trace compounds)
TSP	Sonde de séparation thermique (Thermal Separation Probe)
UAE	Extraction assistée aux ultrasons (Ultrasound Assisted Extraction)
uma	Unité de masse atomique
VIP	Importance des Variables pour la Projection (Variable Importance for
	Projection)
W4M	Workflow4Metabolomics

Introduction générale

L'écologie chimique est une approche pluridisciplinaire qui consiste en l'étude des interactions chimiques entre les organismes vivants et leur environnement biotique (lié à l'activité des êtres vivants) ou abiotique (physique ou chimique, non lié aux êtres vivants). En réponse à un stress, certains végétaux libèrent des composés organiques volatils (COVs) qui vont jouer un rôle de protection contre des stress abiotiques, d'attraction, de répulsion ou de défense contre les prédateurs et agents pathogènes. L'étude de ces COVs nécessite la mise en place d'outils analytiques performants capables d'extraire et de détecter des molécules à l'état de trace dans un environnement chimique complexe. Leur caractérisation implique trois grandes étapes : l'extraction, l'analyse et le traitement des données.

La lavande fine (*Lavandula angustifolia* Miller, 1768) et le lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex. Loisel, 1828) font partis des plantes à parfum, aromatiques et médicinales (PPAM) emblématiques de la Provence et largement exploitées pour leurs huiles essentielles par la parfumerie, la cosmétique et l'aromathérapie. Depuis une quinzaine d'années, les cultures de lavande et de lavandin sont touchées par une maladie couramment nommée « le dépérissement ». Ce dépérissement est principalement dû au phytoplasme du stolbur, *Candidatus* phytoplasma solani, une bactérie sans paroi transmise par un insecte piqueur-suceur, la cicadelle, *Hyalesthes obsoletus*. Les moyens de lutte pour limiter l'étendu du dépérissement sont, à ce jour, assez réduits car il est impossible d'utiliser des antibiotiques ou des insecticides qui tueraient les abeilles ou pourraient se retrouver dans les huiles essentielles. Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier les interactions chimiques entre la cicadelle vectrice, la lavande et le lavandin afin de mieux connaitre les défenses de la plante et de proposer des moyens de lutte alternatifs.

Dans ce contexte, le but principal de ce travail était de développer des méthodes analytiques pour caractériser les composés volatils impliqués dans le dépérissement de la lavande. Ces travaux de thèse relevant du domaine de la chimie analytique et de l'écologie chimique, financés par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche, ont été réalisés au sein du groupe « Métabolome et Valorisation de la Biodiversité Végétale » de l'Institut de Chimie de Nice (UMR CNRS 7272). Ils s'inscrivent dans le projet EUCLIDE qui fait intervenir des partenaires académiques, institutionnels et privés de disciplines variées : le Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE), le Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales (CRIEPPAM), l'INRA d'Avignon, l'Institut de chimie de Nice (ICN), le Laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux plantes aromatiques et médicinales (LBVpam) ainsi que les sociétés Bontoux et Chanel.

Ce projet collaboratif vise à étudier les interactions chimiques impliquées dans le système multitrophique lavande/cicadelle/phytoplasme et de mieux comprendre le dépérissement pour proposer un moyen de lutte alternatif.

Les 5 actions principales ainsi que l'implication des différents acteurs du projet sont les suivantes :

- Action 1 : Étude des composés organiques volatils (COVs) émis et stockés par des plantes saines/infectées par le phytoplasme du stolbur (ICN ; CRIEPPAM ; INRA Avignon)
- Action 2 : Étude métabolomique des composés non volatils, c'est-à-dire la caractérisation des molécules impliquées dans les phénomènes de défenses induites suite à l'infection du phytoplasme (ICN ; CRIEPPAM ; INRA Avignon)
- Action 3 : Étude de la capacité de détection des composés volatils par *H. obsoletus* à l'aide de tests basés sur l'électro-antennographie (CEFE ; CRIEPPAM ; LBVpam ; INRA Avignon)
- Action 4 : Étude de la perception des composés volatils et non volatils par *H. obsoletus via* des tests comportementaux de choix en cage (CRIEPPAM ; INRA Avignon)
- Action 5 : Étude de l'expression des gènes en fonction du statut des plantes saines/infectées (LBVpam ; INRA Avignon)

L'Institut de chimie de Nice (ICN) participe aux actions 1 et 2 qui correspondent respectivement à l'étude des COVs (travaux de thèse présentés) ainsi qu'à la caractérisation des molécules non volatiles (travaux de thèse de Bénédicte HERAL). Ces études ont été réalisées sur deux variétés de lavandes (*maillette* et 7713) et deux variétés de lavandins (*abrial* et *grosso*), sélectionnées par le CRIEPPAM car ce sont des variétés fortement cultivées, présentes sur plusieurs parcelles avec des caractères de sensibilité/tolérance différents.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'action 1, avec pour objectifs :

- (1) de mettre au point une méthode d'échantillonnage et d'analyse permettant de piéger sur le terrain et d'identifier les COVs émis et stockés par différentes variétés de lavande et de lavandin.
- (2) de mettre en avant des différences d'émissions des COVs entre variétés sensibles et tolérantes, plants asymptomatiques et symptomatiques au dépérissement.

Pour répondre à ces questions, le **chapitre l** concerne l'état de l'art sur l'étude des COVs de la lavande et du lavandin. Ce chapitre donne une description botanique de la lavande et du lavandin, présente la problématique du dépérissement de la lavande ainsi que la composition chimique en COVs de ces plantes. Les différentes méthodes d'extraction, d'analyse et de traitement de données principalement utilisées en écologie chimique y sont décrites.

Les chapitres suivants comprennent une publication valorisant le travail effectué, à la suite de laquelle une discussion reprend les principaux résultats publiés et présente des perspectives pour chaque étude.

Le **chapitre II** présente la caractérisation des COVs émis par les parties racinaires de lavande et du lavandin. Le but de cette étude était de pouvoir piéger les composés émis par les racines par microextraction sur phase solide (SPME) et les analyser par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) en laboratoire mais également pouvoir développer une méthode applicable sur le terrain. De plus, dans le cadre du dépérissement de la lavande, le bouquet de COVs peut être modifié lors de l'infection par le phytoplasme par une réponse de la plante que ce soit au niveau des parties aériennes mais aussi au niveau des racines. Une étude sur des racines sensibles et tolérantes a ainsi été menée pour comparer les variabilités d'émissions. Ce chapitre fait l'objet d'un article publié dans Chemistry & Biodiversity : *Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatographymass spectrometry method to study volatile organic compounds (VOCs) emitted by lavender roots*.

Dans le **chapitre III**, une étude métabolomique développée pour caractériser les COVs émis par les parties aériennes des lavandes et des lavandins en champ et basée sur l'extraction en espace de tête dynamique (DHS), la désorption thermique et l'analyse par GC-MS est présentée. Les COVs provenant de variétés de lavandes et de lavandins asymptomatiques et symptomatiques ont été piégés sur le plateau de Sault deux années consécutives (Vaucluse, 2017 et 2018). Pour mettre en évidence les différences d'émissions entre les plants, des analyses statistiques discriminantes ont été réalisées. Ce chapitre fait l'objet d'un article publié dans le journal Metabolomics : *Metabolomic study of volatile compounds emitted by lavender grown under open-field conditions: A potential approach to investigate the yellow decline disease.*

Le **chapitre IV** expose l'étude des COVs stockés dans les inflorescences et les feuilles de lavande et lavandin par l'analyse d'extraits hexaniques. Les prélèvements de parties aériennes ont été réalisés sur les plants utilisés pour les extractions DHS (juillet 2017). Les différents échantillons, feuilles et inflorescences séparées, ont été congelés, lyophilisés, puis broyés. Les COVs stockés ont été extraits par extraction solide-liquide assistée aux ultra-sons et analysés par GC-MS dans le but de comparer les compositions chimiques en COVs stockés dans les plants asymptomatiques et symptomatiques. Ce chapitre fait l'objet d'un article en cours : *Optimisation and application of a metabolomic workflow to characterize stored volatiles compounds involved in the lavender yellow decline disease*.

Le **chapitre V** présente une étude consistant à évaluer les performances et l'intérêt d'un système GC-MS portable pour analyser les COVs de lavande et lavandin sur le terrain (collaboration avec la société PerkinElmer). Les avantages et inconvénients de cette technologie innovante face aux analyses en laboratoire y sont également énoncés. Ce chapitre fait l'objet d'un article accepté dans Phytochemical Analysis : *Field analyses of lavender volatile organic compounds: performance evaluation of a portable gas chromatography-mass spectrometry device*.

Enfin, les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail, ainsi que les perspectives ont été dégagées.

Chapitre I.

Lavande, lavandin et composés organiques volatils (COVs)


Ce premier chapitre décrit les caractéristiques botaniques et chimiques de la lavande et du lavandin ainsi que les moyens d'extraire et d'analyser les composés volatils afin de comprendre leurs rôles en écologie chimique dans le cas du dépérissement de la lavande.

I.1. Lavande et lavandin, deux cultures emblématiques de la Provence

I.1.1. Classification taxonomique

Le genre *Lavandula* appartient à la famille des Lamiaceae qui compte plus de 200 genres de plantes et plus de 7000 espèces [1] (Tableau I-1). Cette famille comprend de nombreuses plantes aromatiques et médicinales comme le thym, le romarin, l'origan, la menthe, la mélisse, la sauge, le basilic ou la sarriette.

Tableau I-1. Classification du genre *Lavandula* selon la classification APG (Angiosperm Phylogeny Group) [2].

Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Genre :	Lavandula

Le genre *Lavandula* est composé de trois sous-genres qui regroupent un total de 39 espèces : *Fabricia, Lavandula* et *Sabaudia* [3, 4] (Figure I-1). Ce genre comprend des douzaines de sousespèces et des centaines d'hybrides et de variétés [5]. Le sous-genre *Lavandula* est divisé lui aussi en 3 sections (*Lavandula, Dentatae* et *Stoechas*) et la section *Lavandula* en 4 espèces cultivées : la **lavande fine (***L. angustifolia***)**, l'espèce la plus commune qui regroupe de nombreuses variétés ; la **lavande aspic (***L. latifolia***)** ; le **lavandin (***L. × intermedia***), un hybride stérile de** *L. angustifolia* **et** *L. latifolia* **; et** *L. lanata***. L'hybridation du lavandin est naturelle et est apparue initiallement dans les Alpes, zone de cohabitation entre les deux espèces. A l'origine, la lavande fine ainsi que de nombreuses autres espèces et variétés tels que les lavandins** *grosso* **étaient cultivés dans le sud de la France [6].**





I.1.2. Description botanique

Les lavandes sont des plantes bisannuelles poussant sur des sols calcaires (lavandes fines et aspic) ou siliceux (lavandes stoechas), secs et ensoleillés. Au sein de la section *Lavandula*, ces petits arbustes de 20 à 60 cm de haut ont une tige ligneuse et vivace [7]. Les feuilles sont simples généralement linéaires, opposées et allongées. L'inflorescence, ensemble de fleurs, est une cyme bipare d'épis c'est-à-dire composé d'un axe principal avec au moins 2 axes secondaires et dont les extrémités se terminent par une inflorescence (épi). La taille, la forme (ovales, triangulaires ou trapézoïdales) et la nervation des bractées varient suivant les espèces de lavande. Les fleurs sont hermaphrodites, ce qui signifie qu'elle possède à la fois les étamines (organes mâles) et les carpelles (organes femelles). Le calice présente cinq sépales soudés en 3 lobes dorsaux et 2 lobes ventraux. La corolle bilabiée, composée de 5 pétales soudés, a une couleur allant généralement du bleu au violet. Les racines pivotantes sont caractérisées par la présence d'une racine principale d'où émergent de nombreuses racines secondaires [8].

Dans le cadre de ce projet de thèse, deux espèces ont été étudiées : la lavande fine (*L. angustifolia* Mill.) et le lavandin (*L. x intermedia* Emeric et Loisel). Comparé à la lavande fine, le lavandin possède des tiges ramifiées (triple inflorescence en cyme bipare d'épis), des inflorescences plus longues de plus de 20 cm et un aspect global de l'arbuste en forme de boule (Figure I-2).



Figure I-2. Morphologie des deux espèces étudiées : lavande fine (A) et le lavandin (B) (schémas d'après [9]).

I.1.3. Cultures de lavandes et lavandins en Provence

La lavande est cultivée dans le monde entier et les principaux producteurs d'huiles essentielles (HE) sont la Bulgarie, la France, la Chine et l'Espagne [10, 11]. En 2016, la France est passée second producteur mondial d'HE de lavande fine (100 tonnes) après la Bulgarie (280 tonnes) [12].

La France reste cependant premier producteur mondial pour le lavandin avec environ 1400 tonnes d'HE en 2016. En 2018, les cultures de lavandin ont été référencées sur plus de 21 000 hectares (ha), dominée principalement par les parcelles de la variété de *grosso* (85 % des superficies de lavandins). Les lavandins *super, sumian* et *abrial* ne représentent que respectivement 6, 5 et 3 % des superficies.

La production de lavandes pour cette même année a été répartie sur 5 700 ha avec une répartition homogène de superficies entre lavandes clonales^[A] et lavandes de population^[B]. 28 % des superficies de lavandes sont représentées par la variété *maillette*.

Définitions

^[A]*Lavande clonale* : issue de boutures. Les plants sont génétiquement similaires entre eux puisqu'ils proviennent de la même plante-mère. Cependant, plus la variété est ancienne, plus il est possible d'avoir de la variabilité génétique. Par exemple, la variété de lavande *diva* présente trois origines différentes non génétiquement identiques.

^[B]*Lavande de population* : issue de croisements interféconds. La lavande de population provient d'une sélection de 7 pieds mère. Les graines de ces croisements ont donné la culture de lavandes de population. Chaque plant est génétiquement différent de son voisin puisqu'il vient d'une graine différente. Des HE de grande qualité sont obtenues à partir de lavandes de population. Les variétés *carla, rapido* et *sara* ont été obtenues par sélection variétale pour la résistance au dépérissement et le stress hydrique.

Ainsi, dans le sud-est de la France, la lavande et le lavandin sont cultivés sur plus de 25 000 ha dont le plateau de Valensole représente le plus grand bassin de production [13] (Figure I-3). D'autre part, le plateau d'Albion, qui comprend le plateau de Sault, présente une surface moyenne de production par commune la plus élevée (505 ha de lavande et lavandin par commune). Lavande et lavandin incarnent donc des plantes emblématiques de la Provence, primordiales pour l'économie régionale à travers la production d'HE, de fleurs et bouquets, de produits transformés (distilleries et produits élaborés) et de miel de lavande. Ces cultures ont également une valeur paysagère qui contribue à l'attrait touristique de la région.



Figure I-3. Distribution géographique des zones de production de lavande et lavandin et emplacement des distilleries (modifiée d'après [13]).

I.2. Le déclin des lavanderaies en France

Depuis quelques années, les champs de lavande subissent un déclin sévère en France visible par une baisse des surfaces cultivées, une diminution de la production en HE et une réduction de la durée d'exploitation d'un champ puisque les producteurs sont contraints d'arracher les plants au bout de trois ou quatre ans, au lieu de 10 à 15 ans habituellement. Ce dépérissement est dû à la combinaison des sécheresses répétées et de différents facteurs présentés ci-après : présence de ravageurs, maladies fongiques ou bactériennes.

I.2.1. Facteurs menaçant les lavandes

I.2.1.1. Ravageurs

D'après les fiches ravageurs établies par le CRIEPPAM (Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales, Manosque), différents ravageurs peuvent se développer sur les plants de lavande et lavandin [13] (Figure I-4) :

A) Les cercopes des prés sont de petits insectes proches des cicadelles et des cigales (insectes hémiptéroïdes). Les larves sécrètent un mucus entourant la tige et les feuilles, et s'y cachent pour se protéger des prédateurs. Lors de leur développement, les larves perforent les tiges et se nourrissent de la sève brute circulant dans le xylème des plantes. Les feuilles peuvent donc devenir crispées et avoir une couleur vert foncé.

- B) Les cochenilles du lavandin sont principalement présentes sur les épis de cette espèce. Les larves se fixent sur les bourgeons et les tiges piquées sont déformées ce qui rend les épis improductifs.
- C) Les **chenilles de tordeuses** se développent sur les jeunes feuilles de lavande et lavandin et provoquent ainsi des dégâts sur le feuillage des plants.
- D) Les noctuelles gamma sont des papillons qui pondent leurs œufs sur les faces intérieures des feuilles lors des flux migratoires. Les chenilles s'y développent durant une vingtaine de jours et induisent des symptômes importants en fonction de leur nombre (dégâts sur feuilles et tiges).
- E) Les **punaises de lavandin** (larves et adultes), notamment l'espèce *Plagiotylus maculatus*, affectent les lavandes en se nourrissant de la sève.
- F) Les cicadelles (Hyalesthes obsoletus), hémiptéroïdes de la famille des Cixiidae, sont des insectes piqueurs-suceurs. Les adultes sont de faible taille (4 mm), présentent des yeux rouges et des ailes translucides. Ils sont notamment vecteurs de maladies à phytoplasmes.



Figure I-4. Photos de ravageurs attaquant les lavandes (Photos CRIEPPAM) : (A) bave de cercope des prés ; (B) cochenille sur épis de lavandin ; (C) chenille tordeuse ; (D) larve de noctuelle sur lavande ; (E) punaise de lavandin ; (F) cicadelle.

I.2.1.2. Maladies fongiques

Des tâche circulaires avec un contour noir ont été observées sur les feuilles de lavande et lavandin en 2018 [13]. Ces symptômes provoquent la septoriose, maladie qui prolifère par temps pluvieux, et entraine le jaunissement et la nécrose des feuilles infectées. L'agent pathogène qui en est l'origine est un champignon ascomycète, *Septoria lavandulae* [14].

D'autres champignons des genres *Phomopsis, Phoma, Septoria, Phytophthora, Alternaria, Fusarium* et *Botrytis* ont également pu être isolés de plants de lavande malades [15]. Les symptômes peuvent être plus importants dans le cas de co-infections comme par exemple la combinaison de septoriose et alternariose (champignons du genre *Alternaria*) qui va entrainer un dessèchement des plants.

I.2.1.3. Les phytoplasmes

Une étude réalisée en 2016 a recensé plus de 370 publications portant sur les maladies des plantes aromatiques et médicinales induites par les phytoplasmes [16]. Ces derniers sont des bactéries procaryotes pathogènes sans paroi cellulaire, classés parmi les Mollicutes et du genre *Candidatus* Phytoplasma. Ils se développent dans les tubes criblés de la sève élaborée (phloème) contenant notamment le saccharose qui alimente les plantes hôtes (Figure I-5). Les phytoplasmes circulent au sein des tubes criblés, cellules allongées à parois transversales communiquant entre elles par des pores appelés cribles.





Le phytoplasme du stolbur (*C*. Phytoplasma solani) est classé au sein du sous-groupe 16SrXII-A regroupant les pathogènes qui affectent de nombreuses cultures et plantes sauvages en zone méditerranéenne telles que les cultures de solanacées, de vignes, de fraises, de betteraves, d'orties, de liserons ou de lavandes. Une même plante peut être infectée par différentes souches de phytoplasme [18].

Le développement du phytoplasme au sein des plantes perturbe son métabolisme et influence la biosynthèse des métabolites [16]. Le Tableau I-2 présente des exemples de modifications de compositions phytochimiques observées dans les HE de plantes médicinales et aromatiques atteintes de maladies à phytoplasmes.

De plus, ces phytoplasmes peuvent aussi être transportés dans les glandes salivaires d'insectes vecteurs telles que les cicadelles ou parfois aussi les psylles, insectes hémiptéroïdes suceur. Les cicadelles participent ainsi à la dissémination des phytoplasmes sur de longues distances [19].

Tableau I-2. Exemples de modifications phytochimiques dans les HE obtenues à partir de plantes aromatiques et médicinales saines ou infectées par le phytoplasme (*C*. phytoplasma sp.) (d'après [16]).

Planto	Maladia	Sous-	Modification phytochimique des HE de plants	
Plante	waldule	groupe	infectés	
			Les HE issues de millepertuis infectées présentaient	
			une quantité plus importante de sesquiterpenes	
Millepertuis	-	16SrVII	tels que le β -caryophyllène, le β -copaène, le γ -	
(Hypericum			amorphène, le δ -élémène, l' α -humulène, et le	
perforatum)			germacrène D alors que la quantité de	
			monoterpènes et d'hydrocarbures aliphatiques	
			était moindre.	
Grindélia			Les HE de plantes atteintes de jaunisse de l'aster	
(Grindelia robusta)	Jaunisse de l'aster	16Srl-B	étaient plus riches en monoterpènes dont le	
(Ormaena robasta)			limonène, le bornéol et l'acétate de bornyle.	
			Dans le cas de la bergamote sauvage, les HE de	
Bergamote sauvage	-	16Srl-B	plantes infectées étaient plus riches en α-thujène,	
(Monarda fistulosa)		16SrXIIA	$\alpha\text{-}$ et $\beta\text{-pinène},\ \beta\text{-phellandrène}$ et $\alpha\text{-caryophyllène}$	
			mais plus pauvres en thymol.	
Hycono			La teneur en limonène observée dans les HE	
(Hussonus officinalis)	-	16SrXII-A	d'hysope infecté était plus élevée que dans les HE	
(Hyssopus officinuits)			obtenues à partir de plantes saines.	
			La jaunisse de l'aster a provoqué une augmentation	
Cohinacáo nourero			de limonène, cis-verbénol, verbénone et carvone	
	Jaunisse de l'aster	16SrIX-C	ainsi qu'une diminution de germacrène D, oxyde de	
(Echinacea purpurea)			caryophyllène et spathulénol dans la composition	
			des HE des plants infectés.	
Conôt d'Economo	Maladia du balai da		Les HE issues de plants de genêt d'Espagne infectés	
		TP2LY-D	présentaient plus de sesquiterpènes mais moins de	
(Spartium junceum)	sorciere	102LA-C	n-alcanes et de composés aliphatiques.	

I.2.1.4. Bilan

Le dépérissement des champs de lavande en France est principalement dû à la présence du phytoplasme du stolbur et probablement combiné à l'augmentation de la fréquence des sécheresses estivales dans la zone de production et/ou à la présence d'autres agents pathogènes cités précédemment [9].

Dans le cas du dépérissement de la lavande, les symptômes typiques sont le jaunissement et la réduction des inflorescences allant jusqu'à la mort prématurée de la plante (Tableau I-3). Ces symptômes suggèrent une modification du métabolisme au sein des lavandes. Le jaunissement, symptôme le plus courant, serait causé par une modification de la synthèse et du transport des glucides [20]. De plus, chez les plantes infectées, la chlorophylle et les caroténoïdes sont dégradés ce qui provoque l'inhibition de la photosynthèse [21].

Des symptomes similaires sont observés dans le cas de stress hydrique : diminution de la croissance, flétrissement des parties aériennes allant jusqu'à la mort de la plante. D'après des études en conditons contrôlées, les lavandes fines sont tolérantes à de forts stress hydriques par une fermeture rapide des stomates permettant une économie d'eau [9]. De plus, des différences de tolérance au stress hydrique ont été observées en fonction des espèces étudiées : le lavandin ainsi que la lavande aspic semblent moins tolérants que la lavande fine. D'autre part, des différences de signature chimique ont été observées chez la lavande fine, le lavandin et la lavande aspic au cours du stress hydrique. Les lavandes fines stressées émettent plus de terpènes que celles non soumises au stress hydrique. Le camphre, le bornéol, le camphène et l'acétate de bornyle sont les composés principalement responsables de cette augmentation.

I.2.2. Cycle de vie de la cicadelle et transmission du phytoplasme

Les plants de lavande et lavandin sont fortement affectés par le phytoplasme car l'insecte vecteur, *H. obsoletus*, effectue son cycle de vie complet sur ces cultures (Figure I-6).



Figure I-6. Cycle de vie de *Hyalesthes obsoletus* et transmission de la maladie du dépérissement sur la lavande (d'après cycle établi par l'ITEIPMAI : Institut technique des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et industrielles). Photos de l'insecte en train de se nourrir sur du lavandin et œufs de *H. obsoletus* (Photos CRIEPPAM, ITEIPMAI).

Tableau I-3. Notation des symptômes du dépérissement de la lavande et du lavandin (d'après des données internes, CRIEPPAM).

Photo / Notation	Observations visuelles de symptômes	Conclusion sur l'état sanitaire de la plante
1	 Feuilles vertes Croissance des feuilles, des rameaux et des tiges florales « normale » Plante bien portante, vigoureuse Absence d'apoplexie (flétrissement des rameaux et/ou des tiges florales) 	Plante sans aucun symptôme visible de dépérissement
2	 Feuilles jaunissantes sur une partie de la plante Et/ou plante chétive (si clone uniquement) Et/ou avec des feuilles peu développées comparées à d'autres plantes de la même parcelle (si clone) Et/ou début d'apoplexie Et/ou présence de 0 à 50 % de bois mort 	Plante avec des symptômes de dépérissement peu prononcés
3	 Feuilles jaunissantes sur l'intégralité de la plante Et/ou plante très chétive (si clone uniquement) Et/ou plante avec peu de feuilles et peu développées comparées à d'autres plantes de la même parcelle (si clone) Et/ou apoplexie de la plante entière Et/ou présence de plus de 50 % de bois mort 	Plante avec des symptômes de dépérissement très prononcés
4	• 100 % de feuilles et de bois mort	Plante morte

Fin août, les œufs sont pondus au collet des plantes, puis les larves se développent dans le sol en se nourrissant des racines entre les mois de septembre à juin (5 stades larvaires, 10 mois). Au début de l'été, les larves remontent sur les tiges et se transforment en adultes ailés. Pendant la période de vol des cicadelles (juin à août), la bactérie se transmet de lavande en lavande lorsque l'insecte pique les tubes criblés du phloème pour se nourrir de la sève. À cette occasion, l'insecte injecte ou prélève des phytoplasmes par son stylet. Après acquisition par l'insecte, les phytoplasmes envahissent l'épithélium de l'intestin puis se propagent lors de l'incubation, en particulier dans les glandes salivaires et sont ainsi transmis de la salive à la sève élaborée [18]. Une fois introduit dans un plant, le phytoplasme obstrue les tubes criblés du phloème où circule la sève, ce qui provoque l'affaiblissement de la plante [22]. Les phytoplasmes se déplacent à l'intérieur des plantes par le phloème [23]. Leur répartition au sein des lavandes fluctue suivant les saisons [19]. Par ailleurs, les niveaux seraient plus faibles dans les racines et modérés dans les tiges. Dans une étude réalisée sur des plants d'*Euphorbia pulcherrima* infectés, la présence de phytoplasme la plus élevée a été trouvée dans les feuilles [23].

Pour évaluer la présence des phytoplasmes dans les plantes, des analyses ont été effectuées par PCR quantitative (qPCR), technique de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité d'ADN (Figure I-7). D'après Sémétey *et al.* (2018), dans la plupart des parcelles étudiées, le phytoplasme semble plus faiblement présent dans les échantillons récoltés au printemps comparés aux mesures effectuées en automne. Seule la variété de lavande fine *bleue*, variété sensible, n'a pas présenté de fluctuation importante au cours de l'année. Il est intéressant de constater que les variétés de lavandins (LIN), considérées comme plus tolérantes au dépérissement, contiennent moins de phytoplasmes.



Figure I-7. Détection par qPCR du phytoplasme présent dans les variétés de lavande fine (LA) ou de lavandin (LIN) en fonction des mois (D : Décembre, M : Mai, J : Juin, J : Juillet, S : Septembre, O : Octobre, N : Novembre) et des emplacements de champs indiqués entre parenthèses. N correspond au nombre d'échantillons testés (figure extraite de [19]).

I.2.3. Sensibilité/tolérance des plants de lavande et lavandin

D'après des observations sur les symptômes de dépérissement réalisées depuis automne 2013, des résultats très différents ont été observés suivant les variétés (données internes au CRIEPPAM). Plus de 75 % des lavandes *maillette*, *1312* et *7713* présentaient des symptômes. A l'opposé, 80 % des lavandins grosso bleu cotta et super PS ne présentaient pas de symptômes. Suite à ces constatations non publiées à ce jour, plusieurs critères pour caractériser la sensibilité/tolérance d'une plante en lien avec l'insecte vecteur ou avec le phytoplasme ont été fixés par le CRIEPPAM :

• Attractivité de l'insecte vecteur

Entre début juillet et fin août 2013, sur une quinzaine de plants de chaque variété, moins de 40 insectes ont été recensés sur les variétés de lavandins *bleu PS, super PS* et *grosso bleu cotta* alors que plus de 100 adultes ont été piégés sur les variétés de lavandes 7713 ou *gabelle*. Les lavandes pourraient être plus attractives que les lavandins.

Au printemps 2013, le comptage du nombre de larves présentes sur les racines de 10 plants de plusieurs variétés a révélé que les variétés de lavandes *7713* et *gabelle* présentaient un nombre plus important de larves au niveau des racines (8 plants présentant entre 1 et 50 larves) contrairement à d'autres variétés telles que *maillette, super, grosso* ou *diva* (aucunes larves). Les variétés de lavande fine *7713* et *gabelle* pourraient être plus favorables au développement des larves.

• Capacité à résister au développement du pathogène

À la suite des résultats qPCR réalisés à l'automne 2012 pour déterminer si le plant contenait le phytoplasme ou non, les lavandes semblaient plus contaminées. 8 plants sur les 10 testés par qPCR se sont révélés positifs pour la variété *gabelle*.

De plus, certaines souches bactériennes peuvent être plus virulentes que d'autres. Ainsi, même si le phytoplasme est présent dans la plante, celui-ci ne développe pas toujours de maladie. Après génotypage des souches détectées dans les lavandes infectées, 15 génotypes différents ont été recensés dans les champs de lavandes dont les plus virulents sont S17, S14 et S16 (présence dans respectivement 57,9 %, 17,7 % et 16,1 % des lavandes infectées). Même si la multiplication de la bactérie au sein des plants infectés serait corrélée à la gravité des symptômes, il est difficile de mesurer la charge en phytoplasme dans les lavandes en raison de la forte fluctuation observée au cours de l'année [19] (Figure I-7).

Des études sont encore en cours au CRIEPPAM pour confirmer les tendances des différents comportements observés d'une variété à l'autre. Dans le cadre de notre projet, la sélection de variétés « sensibles » (lavande 7713 et lavandin *abrial*) ainsi que « tolérantes » (lavande *maillette* et lavandin *grosso*) a été définie par le CRIEPPAM selon ces critères. Il n'existe cependant pas de variété résistante au dépérissement et le caractère sensible/tolérant d'un plant reste à définir plus précisément. Un des objectifs de la thèse, dans le cadre du projet

EUCLIDE, est de **définir s'il existe des différences de compositions chimiques en fonction de la sensibilité/tolérance des plants** (objectif 1) dans le but de mieux comprendre l'infection et de proposer une lutte contre le dépérissement.

I.2.4. Propositions de luttes

A ce jour, aucun traitement n'existe contre le dépérissement de la lavande et les moyens de lutte pour limiter l'étendue de la maladie sont réduits [24]. La lutte directe par l'utilisation de molécules actives contre le phytoplasme, principalement des antibiotiques du groupe des tétracyclines agissant sur la synthèse protéique par fixation au ribosome de la bactérie, n'est pas autorisée sur les cultures en France [25]. Un contrôle chimique à base d'insecticide et visant à supprimer les populations de cicadelles est inenvisageable car cela tuerait également les abeilles. De plus ces agents chimiques se retrouveraient dans les HE et autres produits dérivés à base de lavande.

I.2.4.1. Actions préventives

La lutte repose donc aujourd'hui sur des actions préventives telles que (Figure I-8) [13] :

- l'établissement d'une filière de plants certifiés sains pour fournir aux cultivateurs des plants indemnes de phytoplasme du stolbur dont la traçabilité est contrôlée.
- des pulvérisations d'argile afin d'établir une barrière minérale protectrice qui perturbe l'insecte vecteur de la bactérie. Or, à grande échelle, cela a engendré une diminution des pollinisateurs (non-reconnaissance de la plante hôte, barrière physique).
- l'établissement de couverts végétaux dans le but de perturber le vol de l'insecte à l'aide de « plantes barrières ».
- Ia sélection de plantes plus tolérantes au dépérissement (variétés de lavandes carla, rapido, diva ou sara par exemple).



Figure I-8. Actions préventives réalisées pour lutter contre le dépérissement : « filière de plants sains » (A), couverts végétaux à droite (B) (Photos CRIEPPAM).

Mais, ces actions permettent uniquement de retarder les symptômes et limiter la propagation du phytoplasme. En effet, l'impact des deux canicules de 2003 et 2007 a montré que les variétés dites tolérantes étaient également fortement impactées par la maladie. Face à ce constat de manque de moyens efficaces, d'autres pistes de lutte doivent donc être envisagées.

I.2.4.2. Idées de luttes alternatives

Des essais de mycorhization contrôlée reposant sur la création d'une symbiose entre champignons et racines des plantes, sont réalisés sur des lavandes en champ dans le cadre du projet Mycolav (2017-2020). Ce projet faisant intervenir le CRIEPPAM et la start-up MYCOPHYTO a pour objectifs de protéger les plantes contre les pathogènes racinaires mais aussi d'augmenter le volume de sol exploré, d'optimiser l'absorption en eau et en éléments nutritifs, ou encore de résister aux stress abiotiques (sécheresse, salinité et pollution par les métaux lourds) [26].

Une autre piste serait d'utiliser des prédateurs ou parasitoïdes de la cicadelle. Les nymphes de cette dernière sont notamment attaquées par des araignées et les Miridées, famille d'insectes contenant les punaises, peuvent être des prédateurs des œufs [27].

Une alternative biologique efficace pour diminuer les populations de cicadelles vectrices pourrait être la mise en place de pièges olfactifs. Ces pièges ont pour but d'attirer principalement les insectes ciblés sans appliquer les molécules directement sur les cultures [28]. Jusqu'à présent, les phéromones sexuelles, en particulier celles produites par des femelles, ont été les molécules les plus largement utilisées pour attirer et tuer les ravageurs [29]. Cependant, la cicadelle n'utilise pas de phéromones en tant que signaux chimiques mais des signaux vibratoires pour localiser son partenaire sexuel [30]. Une piste pourrait être de réaliser une confusion sexuelle basée sur l'émission de vibrations pour brouiller la communication entre mâles et femelles, processus qui a d'ailleurs été testé et s'est montré efficace sur la cicadelle de la vigne, *Scaphoideus titanus* [31].

De plus, comme beaucoup d'insectes, les mâles et femelles de *H. obsoletus* utilisent les composés volatils émis par les plantes hôtes pour les localiser [32, 33]. Une autre alternative serait donc d'empêcher l'insecte de localiser la plante hôte. Pour développer ces leurres olfactifs, il est nécessaire de mieux connaître les interactions chimiques (composés volatils) qui pourraient avoir un impact sur l'attraction ou la répulsion de l'insecte vecteur du phytoplasme. C'est pourquoi s'intéresser aux rôles des COVs est primordial pour comprendre les signaux chimiques complexes impliqués dans les interactions entre organismes vivants mais aussi pouvoir proposer une lutte alternative contre le dépérissement.

I.2.4.3. Précédents travaux sur le dépérissement de la lavande

Depuis 2007, à la suite des baisses de production de lavande, plusieurs programmes de recherche ont été menés, tels que des projets financés par le ministère français de l'Agriculture (projets CASDAR, Compte d'Affectation Spéciale « Développement Agricole et Rural ») ayant pour but de mieux comprendre la maladie et envisager des moyens de lutte.

Ces programmes collaboratifs ont impliqué divers instituts techniques (ITEIPMAI, CRIEPPAM, CNPMAI : Conservatoire national des plantes à parfum, médicinales, aromatiques et industrielles), des coopératives, des chambres d'agriculture et lycées horticoles, des laboratoires de recherche de l'INRA (Avignon, Bordeaux, Lyon) ou encore des laboratoires de recherche académique (LBVpam, IMBE : Institut méditerranéen de biodiversité et d'écologie). Le programme ECHoStol (2013-2015) consistait à étudier les facteurs sensoriels intervenant dans le choix de plantes et dans le comportement alimentaire des insectes adultes [34]. L'insecte vecteur, *H. obsoletus*, est responsable du dépérissement de la lavande mais, en raison de sa large gamme d'hôtes, cause également des dégâts sur le tabac ainsi que sur la vigne (maladie du bois noir). L'objectif du projet était d'apporter une meilleure compréhension des interactions plantes cibles et insecte. Dans ce programme, les principaux points cités ci-après ont été abordés : caractériser les facteurs sensoriels guidant l'insecte sur les plantes (facteur olfactif, facteur gustatif, facteur visuel) et chercher un moyen de diminuer l'attractivité des plantes pour l'insecte et étudier la perception des composés par l'insecte.

Pour répondre en partie à ces différents objectifs, des plantes répulsives d'hémiptéroïdes telles que le bulbe d'ail (*Allium sativum*), les feuilles de Dokudami (*Houttuynia cordata*), les graines de Neem (*Azadirachta indica*), les fruits de piment « de Cayenne » (*Capsicum frutescens*) ou encore des feuilles de Tanaisie (*Tanacetum vulgare*) ont été choisies suivant la littérature pour réaliser des tests de répulsion en pulvérisant les extraits sur les plantes hôtes. Aucun extrait n'a apporté d'action répulsive significative contre l'insecte.

Les émissions chimiques provenant de lavandes saines et de lavandes infectées ont été comparées. Pour cela, des piégeages de COVs ont été réalisés, en conditions contrôlées, sur des plants de lavande *gabelle* sains et infectés cultivés en phytotron (température : 22°C, hygrométrie : 70%). L'extraction en espace de tête dynamique à l'aide d'un piège Porapak Q a permis de piéger les COVs émis par les parties aériennes pendant 1h30. Les COVs piégés ont ensuite été élués par du dicholorométhane pour être analysé.

Des piégeages ont également été réalisés sur le terrain par extraction SPME mais ces piégeages par extraction statique ont apporté de fortes variabilités dans les résultats et aucune différence significative entre les plants supposés sains et ceux supposés infectés.

Ces études ont néanmoins mis en évidence que certains composés étaient sur-exprimés chez les plantes infectées. Il s'agit notamment du β -caryophyllène et du β -farnésène qui ont été identifiés comme les molécules les plus discriminantes départageant des plants sains et infectés et préférentiellement émis par les plants infectés. À l'inverse, des composés comme le camphre et le 1,8-cinéole ont été retrouvés préférentiellement chez les plantes saines.

Au final, malgré la difficulté d'étude des COVs restreinte à une courte période en raison du cycle biologique de l'insecte et de la floraison de la lavande, des résultats prometteurs sur les différences de compositions chimiques entre plants infectés et sains ont été obtenus dans le cadre du programme ECHoStol. Les principaux marqueurs identifiés dans cette étude étaient le **β-caryophyllène**, le **β-farnésène**, le **1,8-cinéole** et le **camphre**. Cependant, les études sur plants infectés en phytotron n'ont été réalisées que sur la variété *gabelle* puisque la mortalité des autres variétés infectées était trop élevée. De plus, les études réalisées sur le terrain n'ont

pas permis de séparer distinctement les plants de lavande et lavandin en fonction d'émissions de plants sains ou infectés. Ainsi, l'étude des COVs impliqués dans le dépérissement de la lavande reste un défi à relever pour mieux comprendre des interactions chimiques entre lavande/phytoplasme/insecte.

I.3. <u>Rôles des composés organiques volatils (COVs) dans les interactions entre</u> <u>les organismes vivants</u>

Définition

Les **métabolites** sont des molécules de faibles masses moléculaires (< 500 g/mol) qui proviennent soit du métabolisme primaire indispensable au développement de l'organisme (sucres, nucléotides, acides aminés et lipides), soit du métabolisme secondaire (composés phénoliques, azotés, soufrés et terpénoïdes).

Les plantes produisent jusqu'à 200 000 métabolites différents dont une grande variété de métabolites secondaires, ou spécialisés, jouant un rôle essentiel entre autre dans les processus de défense des plantes [35, 36].

I.3.1. Définition et propriétés des COVs

Les COVs sont des métabolites qui ont un faible poids moléculaire (< 300 g/mol), un point d'ébullition de 50 à 260°C et une pression de vapeur de 10 Pa ou plus à 20°C ce qui les rend volatils [37]. Leur caractère hydrophobe leur permet de traverser les membranes cellulaires et d'être émises dans l'atmosphère [38]. La quantité totale estimée de COVs émis dans l'atmosphère est supérieure à 10¹² kg par année [39]. Ces composés peuvent être d'origine biotique, c'est-à-dire émis principalement par les plantes : on parle de composés organiques volatils d'origine biotique [40].

I.3.2. Rôles des COVs dans les plantes

Les plantes produisent, stockent et émettent des COVs dans l'environnement de manière continue ou suite à un stress biotique (lié à l'activité des êtres vivants) ou abiotique (physique ou chimique, non lié aux êtres vivants) [41]. Il peut donc s'agir soit de composés qu'une plante ne synthétise que lorsqu'elle est attaquée, soit de composés qui sont également synthétisés par les plantes non stressées. Dans ce dernier cas, certains COVs peuvent être sur-exprimés ou sous-exprimés lorsque la plante subit un stress. Par exemple, il a été montré que lorsque les plants de maïs (*Zea mays* L.) sont endommagés, ils produisent significativement plus de COVs que les plantes saines [58]. C'est le cas du (*E*)- β -farnesène qui est surexprimé par les plantes infectées.

L'ensemble des molécules volatiles émises par une plante en réponse à l'attaque d'herbivore sont regroupées sous le terme HIPVs (*Herbivore-Induced Plant Volatiles*). Ces COVs d'origine biotique incluent notamment des dérivés terpéniques, des phénylpropanoïdes, des benzénoïdes, ou encore des composés de faible poids moléculaire constitué de 6 atomes de carbone, nommés GLVs (Green Leaf Volatiles) [40, 42]. Ces GLVs, libérés dans l'atmosphère lorsque les tissus foliaires sont endommagés, représentent un groupe important de COVs incluant des alcools, des aldéhydes et des esters. Ces composés volatils sont produits et libérés rapidement en cas de stress (quelques secondes) contrairement aux terpènes qui ne sont généralement émis qu'après plusieurs heures [43, 44].

Ces COVs biogéniques sont largement étudiés pour leurs divers rôles écologiques détaillés cidessous [45] : tolérance aux stress abiotiques (1), défense de manière indirecte en attirant les carnivores (parasitoïdes ou prédateurs) (2), communication entre plantes ou avec les pollinisateurs (3), et défense directe contre les pathogènes et les herbivores (4) (Figure I-9).



Figure I-9. Différents rôles écologiques des COVs (modifiée d'après [42]).

D'après la littérature, pour **lutter contre le stress oxydatif** (1), les végétaux sont capables de modifier la synthèse ou encore la diffusion des COVs dans l'atmosphère [40]. Par exemple, la sur-expression d'émission en β -caryophyllène ou en isoprène, pourrait protéger les plantes contre les températures élevées [46, 47]. Les émissions de ces composés peuvent augmenter en fonction de facteurs abiotiques (lumière, disponibilité en eau, vent ou ozone) [45, 48, 49].

Les rôles des COVs incluent également des signaux de défense ou d'attraction impliqués dans les interactions entre plantes et herbivores, agents pathogènes, pollinisateurs, parasitoïdes, ou encore les interactions entre plantes/plantes.

Pour **attirer les pollinisateurs** (3) et assurer la reproduction (et l'évolution) des espèces pollinisées par les insectes et oiseaux, de nombreuses plantes émettent des COVs des fleurs ou des fruits [44]. L'odeur émise est un signal que les pollinisateurs peuvent percevoir pour déterminer la fleur qui leur apportera le nectar ou pollen [50]. Les COVs sont utilisés par les pollinisateurs pour trouver des plantes appropriées pour se nourrir mais d'autres COVs semblent utilisés également pour trouver des partenaires pour se reproduire [38, 51]. Certaines émissions en composés volatils des fleurs sont adaptées aux pollinisateurs de chaque plante [52].

Par la **défense directe** (4), les plantes émettent des métabolites secondaires toxiques, qui affectent directement le comportement d'herbivores ou autres agents pathogènes [42]. Rapidement après une blessure, les GLVs émis peuvent affecter les herbivores en raison de leurs propriétés toxiques ou répulsives [44]. Certains herbivores, comme les acariens, les pucerons, ou les papillons nocturnes sont repoussés par les HIPVs [53].

Dans le cas de **défense indirecte** (2), la plante est capable de modifier son bouquet d'odorant pour attirer des ennemis naturels des herbivores [42, 51, 54–56]. On parle d'interactions tritrophiques entre plante-herbivore-carnivore ou « d'appel à l'aide ». Par exemple, dans le sol, les racines de maïs libèrent du β -caryophyllène en réponse à l'alimentation des larves de *Diabrotica virgifira virgifera*, pathogène du maïs [57]. Cette molécule induit un signal souterrain qui attire des nématodes, ennemis des herbivores qui se nourrissent de racines. Les HIPVs peuvent également agir sur les organismes carnivores, les nématodes parasites ou encore sur les plantes voisines [53].

De plus, les COVs interviennent dans des **interactions plantes-plantes** (3). La plante attaquée émet des COVS qui vont induire une réaction chimique chez les plantes saines voisines entrainant l'activation des gènes de défense de ces dernières [44]. Les COVS produis par la plante attaquée peuvent être libérés par les parties aériennes de la plante dans l'atmosphère ou par les racines en milieu souterrain [58]. Ces communications entre plantes voisines sont souvent étudiées en agriculture lors de la mise en place de couverts végétaux ou la création d'herbicides naturels [59].

Dans le cadre du dépérissement de la lavande, on peut se demander s'il existe cette thèse a pour but de voir s'il existe un bouquet d'odorant capable :

- d'attirer ou repousser la cicadelle, vectrice du phytoplasme
- **de limiter la propagation du phytoplasme** suite à la compréhension des modifications chimiques (COVs émis et stockés) impliquées dans le dépérissement.

I.4. Diversité chimique des composés volatils émis et stockés par la lavande

Au sein du sous-genre *Lavandula*, une diversité de composés volatils, allant des composés très volatils (C_6) jusqu'à des composés plus lourds (C_{18}), a été répertoriée dans la littérature (Annexe 1). Parmi ces composés, on trouve principalement les composés terpéniques (monterpènes et sesquiterpènes) mais également des « Green Leaf Volatiles » ainsi que des coumarines.

I.4.1. Composés terpéniques

I.4.1.1. Définitions

Les terpènes sont des hydrocarbures constitués de plusieurs unités d'isoprène (C_5H_8) [60]. Ils sont classés selon le nombre d'unités isopréniques C_5 qui les compose : hemi- (C_5), mono-(C_{10}), sesqui- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}) et tetraterpènes (C_{40}). Par succession de réactions classiques (cyclisations, fonctionnalisations ou réarrangements), des dérivés de structures apparentées et variées sont formés (alcools, aldéhydes, cétones, acides) [61]. Plus de 40 000 composés terpéniques sont référencés dans les plantes, ce qui en fait les métabolites secondaires végétaux les plus abondants [62]. Les composés terpéniques volatils constituent la plus grande classe de composés sont largement émis par les plantes, principalement par les fleurs mais aussi par les racines, les tiges, les feuilles, les fruits ou les graines même si ce sont majoritairement les fleurs qui émettent le plus (plus de 1700 composés) [6, 63–65].

Parmi tous les composés terpéniques, les mono- (C₁₀) et sesquiterpènes (C₁₅) sont les plus fréquemment étudiés dans le genre *Lavandula* en raison de leur abondance dans les HE et de leurs divers intérêts : rôles écologiques (interactions plante-plante, défense face aux pathogènes/herbivores), utilisations en parfumerie, cosmétique ou en aromathérapie [66]. Dans la lavande, environ 200 monoterpènes et sesquiterpènes ont été caractérisés à ce jour [67]. Le Tableau I-4 résume les principaux composés présents dans les espèces du sous-genre *Lavandula*. Cependant, les auteurs ne précisent souvent pas l'espèce, la variété ou les pourcentages relatifs des composés présents dans la plante. De plus, peu d'études ont été menées sur les COVs émis. En effet, l'HE obtenue par distillation concerne les COVs stockés dans les trichomes présents dans la plante et ceux issus de réactions provoquées lors de la distillation et non les COVs produits puis émis directement sans être stockés dans des organes spéciaux.

I.4.1.2. Biosynthèse

La biosynthèse des terpénoïdes dans le genre *Lavandula* a été présentée dans de nombreuses publications et ne sera que brièvement abordée ici (Figure I-10) [4, 60, 67, 68].

La formation des composés terpéniques peut être séparée en trois phases :

- (i) Formation de l'unité isoprène (C₅).
- (ii) Condensation des unités isoprène, isopentenyl diphosphate (IPP) et diméthylallyl diphosphate (DMAPP), par les phényltransférases donnant notamment le géranyle diphosphate (GPP), précurseur des monoterpènes et le farnésyl-pyrophosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes.
- (iii) Catalyse par les terpènes synthases et autres transformations éventuelles (hydroxylations, oxydations, méthylations) [69].



Acetyl-CoA, Acetyl coenzyme A; DMAPP, Dimethylallyl diphosphate; DOXP, 1-Deoxy-D-xylulose 5phosphate; DXR,1-Deoxy-D-xylulose5-phosphate (DX) reductoisomerase; FPP, Farnesyl diphosphate; GAP, Glyceraldehyde 3-phosphate; GGPP, Geranyl geranyl diphosphate; GPP, Geranyl diphosphate; HMBPP, 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphate; HMG-CoA, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; IPP, Isopentenyl diphosphate; MECP, 2-C-methylerythritol-2,4-cyclodiphosphate; MVA, mevalonic acid; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate; LaBERS, Bergamotene synthase; LALINS, Linalool synthase; LALIMS, Limonene synthase.

Figure I-10. Voies de biosynthèse des terpènes (d'après [4]).

I.4.1.3. Monoterpènes et monoterpénoïdes

Dans le sous-genre *Lavandula*, plus d'une centaine de monoterpènes volatils ont été identifiés à ce jour (Annexe 1). Des exemples de structures de monoterpènes identifiées dans le genre *Lavandula* sont présentés en Figure I-11. Il a été choisi de regrouper les monoterpènes suivant deux groupes : les monoterpènes oxygénés et les autres monoterpènes non oxygénés. Les principaux composés présents dans les HE de lavande et lavandin, sont les monoterpènes oxygénés (environ 80 composés référencés) dont préférentiellement des alcools. Le linalol (1) et l'acétate de linalyle (2), monoterpènes oxygénés exposés dans la Figure I-11, sont présentés comme les composés majoritairement identifiés dans les HE de lavande. Le linalol est notamment détecté dans toutes les variétés du sous-genre *Lavandula* étudiées dans la littérature à ce jour (Annexe 1). A ces deux composés s'ajoutent le bornéol, le camphre (3) et également le 1,8-cinéole (4) qui sont identifiés dans de nombreuses variétés que ce soit de lavande ou lavandin.

De plus, d'autres monoterpènes oxygénés, non mentionnés dans le Tableau I-4, sont particulièrement présents dans *L. x intermedia* [70]. C'est le cas du lavandulol (6), classé dans les monoterpènes oxygénés en Annexe 1 et de son ester, l'acétate de lavandulyle (7) qui a été reporté dans la littérature dans de nombreuses variétés de lavandin (*abrial, grosso, sumian, sumiens* et *super*).

Au sein des monoterpènes hydrocarbonés, l' α et le β -pinène ainsi que le camphène sont retrouvés dans plusieurs variétés (Tableau I-4 et Annexe 1). Les différents isomères d'ocimène sont également bien représentés dans le genre Lavandula même si suivant les publications, la distinction entre les isomères (E) et (Z) n'est pas forcément réalisée (Annexe 1). Dans cette même catégorie de monoterpènes, on trouve aussi le limonène (5) qui est produit par de nombreuses variétés de lavande et lavandin, mais en plus faibles quantités (Tableau I-4). Dans le sous-genre Lavandula, les compositions chimiques varient en fonction des sections (Lavandula/Dentatae/Stoechas), des espèces et des variétés. D'après le Tableau I-4, les composés principaux différents selon les espèces de la section Lavandula sont : acétate de linalyle et linalol pour L. angustifolia et L. x intermedia, camphre et 1,8-cinéole pour L. lanata, et 1,8-cinéole et linalol pour L. latifolia. Les espèces et variétés à forte teneur en camphre (3) comme L. x lanata sont moins utilisées en parfumerie [6]. Dans la section Stoechas, le 1,8cinéole est dominant chez L. viridis tandis que la fenchone et le camphre sont considérés comme les composés majeurs de L. stoechas. Selon la littérature, le linalol et l'acétate de linalyle sont peu, voire pas représentés dans la section Stoechas (Tableau I-4). Ces différentes compositions chimiques influencent les propriétés olfactives des différentes espèces.



Figure I-11. Exemples de structures de mono- et sesquiterpènes détectés dans le genre *Lavandula*. (1) linalol, (2) acétate de linalyle, (3) camphre, (4) 1,8-cineole, (5) limonène, (6) lavandulol, (7) acétate de lavandulyle, (8) β -caryophyllène.

Il est à noter que l'identification de certains monoterpènes uniquement cités dans une publication semble toutefois douteuse. On peut évoquer les monoterpènes hydrocarbonés suivant : le *cis*-pinane identifié dans *L. stoechas stoechas* [71], le sylvestrène reporté dans *L. angustifolia* [72], ou encore l'isoterpinolène identifié dans la lavande *L. angustifolia maillette* et les lavandins *L. x intermedia grosso, sumiens, super* [73].

Tableau I-4. Principaux COVs identifiés après (hydro-)distillation ou extractions en espace de tête^[a] à partir d'inflorescences et de feuilles du genre *Lavandula* (sous-genre *Lavandula*).

	Lavandula					Dentatae		Stoechas						
		L anaustifol	ia	Llanata	L.		l vinte	ermedia		l dentata	L.	L. stoechas	L.	L.
Composés majoritaires		L. ungustijoi	iu -	E. Idilata	latifolia	L. X Intermedia			L. UEMulu	pedunculata	luisieri	stoechas	viridis	
	-	maillette	matherone	-	-	abrial	grosso	sumian	super	-	-	-	-	-
Cétone														
3-octanone	+[a]	+	+	-	tr.	tr.	-	+	tr.	-	-	-	-	-
Monoterpène hydrocarbonés														
α- and β-pinène	+ ^[a]	+	+	+ ^[a]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ^[a]
camphène	+	+	+	+[a]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+[a]
(Z)- and (E)-ocimène	+ ^[a]	+	+	+ ^[a]	+	+	+	+	+	-	-	+	tr.	+
limonène	+	+	+	+ ^[a]	+	+	+	+	+	-	+	+	+	tr.
myrcène	+ [a]	+	+	+[a]	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+[a]
Monoterpènes oxygénés														
1,8-cinéole	+	+	+	+++ ^[a]	+++	+	+	++	+	++	++	++	+	++++ ^[a]
α- and γ-terpinéol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+[a]
bornéol	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	-	+	+	+[a]
camphre	+	+	+	+++ (++++ ^[a])	++	+	+	+	+	++	+	++	++	+ (++ ^[a])
fenchone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++	+	+++	-
lavandulol	+ ^[a]	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
acétate de lavandulyle	+ ^[a]	+	-	-	tr.	+	+	+	+	-	+	+	+	-
linalol	+++[a]	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+
acétate de linalyle	+++ (++ ^[a])	+++	+++	-	+	++	++	++	++	-	-	+	tr.	-
terpinène-4-ol	+ (++ ^[a])	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	- (+ ^[a])
Sesquiterpenes														
caryophyllène et dérivés	+[a]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
farnésène	+ ^[a]	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Références	[4, 72, 74– 77]	[73, 78]	[78]	[76, 79]	[4, 74, 77, 80]	[4, 78, 81]	[4, 73, 74, 78, 81]	[4, 73, 78]	[4, 73, 74, 78, 81]	[76, 82, 83]	[84]	[85, 86]	[71, 76, 87, 88]	[76, 84, 89]
tr. (composés à l'état de traces), +, ++, +++, ++++ font références respectivement aux composés détectés avec un pourcentage relatif < 0,1 %, entre 0,1 et 10 %, entre 10 et 30 %, entre 30 et 50 %, > 50 %.														

I.4.1.4. Sesquiterpenes et sesquiterpénoïdes

Dans le genre *Lavandula*, plus d'une centaine de dérivés sesquiterpéniques ont été identifiés dont plus de 70 d'entre eux sont des sesquiterpènes (Annexe 1). Parmi les sesquiterpènes, les différents isomères de caryophyllène incluant principalement le β -caryophyllène (8) sont majoritairement présents dans la plupart des variétés étudiées (Tableau I-4) [24]. Les isomères de farnésène (configuration *Z* ou *E*) sont également bien représentés dans le sous-genre *Lavandula*.

Les sesquiterpènes oxygénés sont préférentiellement présents dans les variétés de la section *Stoechas* même si les oxydes de caryophyllène ont été identifiés dans toutes les espèces étudiées. Pour la plupart de ces sesquiterpènes cités dans la littérature, souvent seule une ou deux publications font références à la présence d'un composé (Annexe 1).

Plus minoritairement, on trouve des GLVs émis habituellement par les feuilles suite à une blessure tels que le (Z)-3-hexen-1-ol, mais aussi divers esters et alcools ainsi que des coumarines (coumarine et 7-méthoxycoumarine) [74].

I.4.2. Green Leaf Volatiles

Les GLVs sont formés à partir des acides linoléniques et linoléiques et proviennent principalement de l'action de deux enzymes : la lipoxygénase et l'hydroperoxide lyase [90]. Des structures de GLVs sont représentées en Figure I-12.



Figure I-12. Structures de (1) l'acétate d'hexyle et du (2) (Z)-3-hexen-1-ol.

L'acétate d'hexyle (1), composé en C₈, semble être le GLV le plus fréquemment détecté dans le sous-genre *Lavandula* par son identification dans deux variétés de lavande fine et quatre de lavandin. Seuls deux composés contenant 6 atomes de carbone ont été identifiés au sein de variétés de lavandin : 4-hexen-1-ol et alcool hexylique [81]. L'identification de ces deux composés n'a pas été confirmée par un standard. Or, dans le cas du 4-hexen-1-ol, le spectre de masse et l'indice de rétention sont similaires à ceux du (*Z*)-3-hexen-1-ol, GLV plus commun dans les extraits de feuilles de végétaux [91]. Ainsi, on peut supposer que le composé supposé être le 4-hexen-1-ol serait en fait du 3-hexen-1-ol.

I.4.3. Coumarines

Les coumarines sont des dérivés d'acides hydroxycinnamiques formés par cyclisation oxydative (Figure I-13). Dans le sous-genre *Lavandula*, la coumarine (1) a été identifiée dans des HE obtenues à partir de *L. angustifolia*, *L. latifolia* ou encore *L. intermedia* alors que la 7-méthoxycoumarine (2) n'a été détectée que dans l'HE de *L. latifolia*.



Figure I-13. Structures chimiques de (1) la coumarine et (2) la 7-méthoxycoumarine.

I.4.4. Stéréochimie des molécules volatiles

La stéréochimie concerne l'arrangement des atomes dans l'espace et permet la distinction des stéréoisomères *Z/E* (pour les doubles liaisons), *cis/trans* (pour les cycles) ou *R/S* (pour les carbones asymétriques) [92].

I.4.4.1. Configuration Z/E

Le ratio entre les configurations (Z)/(E) des GLVs libérés suite à une blessure a notamment été étudié sur *Nicotiana attenuata* [93]. Comparées aux plants témoins (ratios Z/E de l'hexenal ou de l'hexenol respectivement de 6 et 2), les plantes attaquées par des chenilles *Manduca sexta* émettent moins de (Z)-GLVs mais plus de (E)-GLVs ce qui attire les prédateurs *Geocoris* spp. des herbivores (ratios Z/E de l'hexenal ou de l'hexenol respectivement de 1 et 0,5).

Ainsi, l'étude des isomères peut s'avérer intéressante en écologie dans le contexte du dépérissement de la lavande. Que ce soit les sesquiterpènes (*Z*) et (*E*)-farnésène, ou encore les monoterpènes (*Z*) et (*E*)-ocimène, ces isomères semblent très représentés dans de nombreuses variétés du sous-genre *Lavandula* (Annexe 1). D'après la littérature, au sein de certaines espèces, un seul isomère a été reporté ; c'est le cas du (*Z*)-bisabolène détecté dans *L. cariensis, L. latifolia,* et *L. stoechas.*

I.4.4.2. Configuration R/S

Dans une étude sur les énantiomères de diverses HE [94], il a été montré que les deux énantiomères du linalol (Figure I-11) sont détectés dans la nature mais que le (R)-linalol est plus fréquent que le (S)-linalol sur une sélection de plusieurs HE. C'est également le cas dans les HE de lavande, l'énantiomère (R) est très présent, contrairement à l'énantiomère (S), qui est présent en faible abondance (Tableau I-5) [95]. Cependant, l'énantiomère (R) a une odeur

plus faible que l'énantiomère (S). Il a une odeur boisée, tandis que le (S)-linalol est caractérisé comme doux, floral, herbacé et avec des notes fruitées et d'agrumes [96].

	Lavandula					Stoechas
	L. angustifolia	L. latifolia	L. x inter	L. x intermedia		L. stoechas
Composés majoritaires	-	-	abrial	grosso	super	-
(<i>R</i>)-α-phellandrène	+++	-	-	-	-	-
(S)-α-phellandrène	++++	-	-	-	-	-
(R)-α-pinène	++++	++++	++++	++++	++++	++++
(S)-α-pinène	+/++	++	+	+	+	+
(R)-α-terpinéol	++++	++++	++++	++++	++++	++++
(S)-α-terpinéol	++	+++	++	++	+	+
(<i>R</i>)-β-pinène	++++	++++	++++	++++	++++	++++
(<i>S</i>)-β-pinène	+/++	+++	+++	++	+	++
(R)-bornéol	++++	++++	++++	++++	++++	++++
(S)-bornéol	+/++	++	+	+	+	+
(R)-camphène	+/++++	+++	+++	++++	++++	++
(S)-camphène	++++/++	++++	++++	++	++	++++
(R)-camphre	+++/++++	++++	++++	++++	++++	++++
(S)-camphre	++++/+	+	+	+	+	++
(R)-limonène	++++	++++	++++	++++	++++	++++
(S)-limonène	+/+++	+	+	+	+	+
(R)-linalol	++++	++++	++++	++++	++++	++++
(S)-linalol	+	+	+	+	+	+
(R)-acétate de linalyle	++++	++++	-	-	-	-
(S)-acétate de linalyle	+	+	-	-	-	-
(R)-terpinène-4-ol	+/++	+	+	+	+	++
(S)-terpinène-4-ol	++++	++++	++++	++++	++++	+++
Références	[77, 97, 98]	[77]	[81]	[81]	[81]	[88]
tr. (composés à l'état de trac	es), +, ++, +++, ++-	++ font référen	ces respec	tivement au	x composé	s détectés avec
un pourcentage relatif < 0,1 %, entre 0,1 et 10 %, entre 10 et 30 %, entre 30 et 50 %, > 50 %.						

Tableau I-5.	Distribution	énantiomérique	dans les HE d	e six lavandes	(sous-genre	Lavandula).
		chantionichique		e on la fanaco	(see Serie	

Selon la littérature, l'énantiomère (*R*) domine pour les composés suivants : α -pinène, β -pinène, limonène, linalol, camphre, bornéol, acétate de linalyle, α -terpinéol alors que l'énantiomère (*S*) est dominant pour les molécules suivantes : α -phellandrène, terpinène-4-ol pour la majorité des six HE de lavande présentées dans le Tableau I-5. La distribution énantiomérique du camphène est différente dans chaque lavande : les variétés de lavandin *grosso* et *super* contiennent plus d'énantiomère (*R*) que les autres variétés. A ce jour, aucune information n'a été trouvée sur la répartition de l' α -phellandrène et de l'acétate de linalyle chez *L. latifolia*, *L. x intermedia* et *L. stoechas*. Peu d'études ont été réalisées sur tous les énantiomères des COVs de lavande. De plus, les pourcentages de distribution des énantiomères peuvent varier d'une publication à l'autre. Pour cette raison, les résultats

présentés dans le Tableau I-5 ne sont qu'une indication de la distribution énantiomérique au sein du genre *Lavandula*.

On peut se demander si l'étude des ratios isomériques entre plants de lavande asymptomatique/symptomatique peut expliquer des différences d'attraction/répulsion ou d'infection.

En intervenant dans la survie de la plante et leur adaptation à l'environnement, les COVs présentent un intérêt scientifique majeur en écologie chimique [59]. Néanmmoins, leur étude nécessite de développer des méthodes analytiques performantes en raison de leur faible teneur, de la complexité des mélanges à analyser et de la diversité structurale des composés d'intérêts (monterpènes, sesquiterpènes, GLVs dans le sous-genre *Lavandula*). Afin d'étudier cette diversité chimique dans un environnement complexe, comme c'est le cas pour l'étude du dépérissemment de la lavande, la mise en place d'une stratégie métabolomique est indispensable [99].

I.5. Étude métabolomique des COVs en écologie

I.5.1. Définition de la métabolomique

Les études « -omiques » incluant la génomique (étude des gènes), transcriptomique (étude des ARN messagers), la protéomique (étude des protéines) et la métabolomique (étude des métabolites) sont des outils permettant de décrire et comprendre le fonctionnement d'un organisme (Figure I-14) [100]. La métabolomique consiste à mesurer le plus grand nombre possible de métabolites présent dans un système biologique donné et dans des conditions définies [100]. Elle est actuellement en plein essor et offre une nouvelle approche dans l'identification de molécules impliquées dans les interactions chimiques [101, 102].

Les résultats obtenus suite à l'analyse des échantillons biologiques sont utilisés dans le cadre d'études statistiques. L'étude métabolomique regroupe l'identification et l'analyse comparative de métabolites. Deux approches sont possibles :

- **Approche ciblée** : caractériser la modification d'un ou plusieurs métabolites connus en particulier.
- Approche non ciblée : étudier l'ensemble des modifications du métabolome et caractériser le ou les métabolites impliqués dans les modifications et identifier des bioindicateurs suite aux analyses statistiques. C'est cette approche qui a été utilisée dans la suite du manuscrit afin d'avoir une vue globale des molécules impliquées dans les variations d'émissions entre des plants asymptomatiques/symptomatiques, sensibles/tolérants.



Figure I-14. Place de la métabolomique dans les techniques en « -omiques ».

Les outils de métabolomique permettent de travailler sur des ensembles de données complexes et offrent donc une approche intéressante dans la compréhension des organismes et des écosystèmes. En 2011, Sardans *et al.* font un bilan sur les avancées des études métabolomique en écologie [103]. Des exemples d'études récentes impliquant les COVs dans les interactions entre divers organismes tels que les relations plantes/champignons ou encore les interactions plantes/insectes sont présentées dans le Tableau I-6. Ce tableau non exhaustif indique toutefois que la caractérisation et l'identification des métabolites secondaires est au cœur des recherches actuelles en écologie que ce soit en recherche fondamentale ou appliquée pour répondre à des questions écologiques précises [101]. De plus, il met en évidence les différentes étapes qui composent une étude métabolomique sur les COVs : collecte des échantillons, extraction, analyse des extraits généralement par chromatographie en phase gazeuse et traitement des données par des logiciels statistiques.

Tableau I-6. Exemples d'études métabolomiques développées pour l'étude des COVs impliqués dans des problématiques écologiques.

Année	Matériel d'étude	Méthode de	Technique	Logiciel de	Question scientifique	Référence
-		collecte/extraction	d'analyse	traitement		
2018	Peuplier (<i>Populus x canescens</i>) et chrysomèle du peuplier (<i>C.</i>	HSSE Extraction sur barreau aimanté (twister)	GC-MS	R	Quel est l'impact des champignons mycorhiziens sur l'infection des peupliers par la chrysomèle du	[104]
	populij					
2018	Boutures de Cabernet Sauvignon (<i>Vitis vinifera</i> L.)	HS-SPME sur feuilles broyées	GC-MS	Metabo-Analyst	résistance au stress hydrique par les plants de vignes ?	[105]
2017	Inule visqueuse (<i>Dittrichia</i> <i>viscosa L.)</i>	Prélèvement de l'espace de tête par une seringue à gaz	GC-MS	Metabo-Analyst	Quel est le potentiel allélopathique des COVs émis par l'inule visqueuse sur la laitue (<i>Lactuca sativa</i> L.)?	[106]
2017	Feuilles de tomates, cultivar Rio Grande et bactéries Pseudomonas syringae	HS-SPME sur feuilles broyées	GC-MS	SIMCA-P	Quels sont les différences de profils chimiques entre les COVs des feuilles de tomates infectées par les souches avirulentes et virulentes ?	[107]
2017	Feuilles de 7 espèces de Citrus	HS-SPME sur feuilles broyées	GC-MS	-	Comment les plantes du genre <i>Citrus</i> répondent-elles à un stress ?	[108]
2016	Concombres (Cucumis sativus)	SPME sur tissus broyés	GC-MS	R	Quels sont les COVs produits en fonction des différents tissus des plantes ?	[109]
2013	Feuilles de <i>Citrus,</i> psylle <i>Diaphorina citri</i> et le pathogène <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus	Extraction solvant (<i>n</i> -hexane)	GC-MS	JMP	Quel est l'effet de l'infection du pathogène, de l'infection par la psylle ainisi que de la double attaque pathogène/psylle sur le bouquet de COVs des feuilles d'agrumes ?	[110]
2016	Feuilles de <i>Punica granatum</i> sous stress hydrique ou sans	HS-SPME sur feuilles broyées	GC-MS	Statistica	Quels sont les COVs caractéristiques impliqués dans le mécanisme de résistance à la sécheresse développé par les feuilles de <i>Punica granatum</i> ?	[111]
2017	Feuilles de <i>Myrcius splendens</i> avec ou sans galles	HS-SPME sur feuilles broyées	GC-MS	XLStat	Quels sont les substances volatiles qui diffèrent entre les feuilles avec ou sans galles ?	[112]
HSSE : H GC-MS Les mét	leadspace Sorptive Extraction ; HS : Gas chromatography-Mass spect :hodes d'extraction ainsi que les m	-SPME : Headspace-Solid Phase N rometry. éthodes d'analyses évoquées sor	Aicroextraction	n. espectivement dans	s les parties 1.6 et 1.7	

La stratégie généralement employée dans le cas d'étude en écologie chimique est présentée dans le schéma ci-dessous :



Figure I-15. Etapes de la stratégie d'étude employée.

Ainsi, à partir d'un problème écologique, l'objectif est d'identifier un ou des marqueur(s) chimique, c'est-à-dire des molécules pouvant mettre en évidence par leur présence au sein de la l'organisme un phénomène particulier (infection par exemple).

I.6. <u>Extraction des COVs¹</u>

Pour extraire les composés volatils des plantes, il existe deux grandes catégories d'extraction : l'extraction par solvant pour extraire les composés stockés et l'extraction par espace de tête pour piéger les composés émis.

I.6.1. Extraction des COVs stockés

Les COVs présents dans les HE, qui sont des extraits obtenus par distillation, sont principalement étudiés en parfumerie (Tableau I-7). Généralement, pour extraire les COVs stockés, des extractions solide-liquide sont employées telle que l'extraction à l'aide d'un montage de Soxhlet qui consiste à réaliser une extraction par solvant à chaud en continue pour épuiser la matière première végétale [113–115]. Ce type d'extraction a par exemple été réalisé pendant 3 h sur 40 g de fleurs de lavande broyées avec 300 mL d'hexane [113]. Des alcools, caractérisés par GC-MS, représentaient les COVs majoritaires dans ces extraits hexaniques. Par cette même approche (extraction solide-liquide et analyse en GC-MS), des extraits obtenus à partir de feuilles et de tiges de *L. angustifolia* se sont montré riches en diverses familles de composés : coumarines, tannins, flavonoïdes, ou encore des acides gras [114]. Néanmoins, ces techniques ne sont pas adaptées à une étude en écologie en raison de la faible quantité d'échantillon et du chauffage qui peut induire la dégradation des molécules.

¹ Cette partie est basée sur la revue suivante : STIERLIN É., MICHEL T., FERNANDEZ X., Techniques d'extraction des composés organiques volatils en écologie chimique, Spectra Analyse, 2017, 316, 43-52.

Procédé d'extraction		Solvant	Procédé analytique	Références
Extraction solide-liquide	Macération	n-hexane, n-butane, diméthyléther	GC-MS	[72, 116–118]
		et HFO-1234ze		
	Par montage de Soxhlet	<i>n</i> -hexane	GC-MS	[113–115]
	Assistée aux ultra-sons	Éthanol-eau + <i>n</i> -hexane	GC-MS/FID	[119]
Distillation	Hydrodistillation (HD)	-	GC-MS	[71, 73, 75, 82,
			GC/FID	87, 113, 119–122,
			RMN	122–130]
	Entraînement à la vapeur	-	GC-MS	[77, 80, 81, 115,
			Fast-GC-MS	131–136]
			GC-O	
			RMN	
Extraction en espace de tête	Microextration sur phase solide	-	GC-MS	[72, 89]
	Introduction directe du matériel végétal	-	ATD-GC-MS	[85]
	dans un tube en PTFE placé dans une			
	cartouche de désorption en acier			
	Extraction en espace de tête dynamique	-	GC-MS/FID	[76]
Extraction assistée par micro-	ondes	-	GC-MS/FID	[124, 137]
Extraction au CO ₂ supercritiqu	le	-	GC-MS/FID	[113, 119, 126,
				128]
ATD: Automated Thermal Dese	orption			
GC-MS/FID: Gas chromatograp	bhy-Mass spectrometry/Flame ionization de	etector		
GC-O: Gas Chromatography-O	ITactometry			
Les méthodes d'extraction ain	si que les méthodes d'analyses évoquées so	ont explicitées respectivement dans la l	partie 1.6 et 1.7.	

En écologie, les COVs stockés dans les tissus peuvent être extraits à l'aide de solvant(s) organique(s) sans altérer les composés par le chauffage à haute température [138]. Différents solvants apolaires permettant d'extraire les composés peu polaires peuvent être utilisés tels que le cyclohexane [139], le pentane [140], le dichlorométhane [141], ou encore l'hexane [142]. Sans compter les études sur les huiles essentielles obtenues par distillation et pouvant présenter des artefacts, peu d'études font références aux COVs stockés par la lavande [34]. Dans la plupart des cas, le solvant employé est l'hexane [72, 115–117]. Ainsi, An et al. (2001) ont extrait les COVs stockés des inflorescences de lavande fine par macération pendant 1 h avec 10 mL d'hexane [72]. De même, Guitton et al. (2010) ont collecté des échantillons d'inflorescences de différentes variétés de lavandes (7713, C15-50, matherone) et lavandins (grosso, super, certitude), puis extraits les COVs par macération des fleurs et feuilles dans de l'hexane pendant une nuit à 4°C dans le but de comparer les compositions en terpènes suivant les organes [116]. Rapinel et al. (2018) ont réalisé trois macérations successives à partir de 100 g de fleurs de lavande fine sèches dans 0,9 L d'hexane [117]. Cependant, l'utilisation de ce solvant présente une limite, il extrait non seulement les composés volatils mais également des cires ou pigments [113]. Des alternatives par l'utilisation de solvants verts se développent face aux macérations utilisant l'hexane. Pour étudier les COVs de lavande, l'extraction au CO₂ supercritique est par exemple utilisée pour réduire le temps d'extraction long lors de la distillation et éviter la dégradation des composés actifs [126, 143].

I.6.2. Piégeage des COVs émis

Les techniques de prélèvements en espace de tête sont privilégiées en écologie chimique pour éviter de détruire et de perturber le ou les organismes cibles. L'espace de tête correspond ici à la phase gazeuse présente au voisinage de la plante et dans laquelle les COVs émis par la plante diffusent. De plus, ces échantillonnages ne révèlent pas forcément les mêmes composés qu'à la suite d'extractions par solvants (destruction du matériel végétal). Pour collecter un volume d'air respectivement de l'ordre du millilitre ou du litre, des seringues à gaz ou des sacs en matières inertes telles que le Tedlar[®] (polyfluorure de vinyle), Nalophan (polyéthylène téréphtalate) ou PTFE (polytétrafluoroéthylène) sont employés (Figure I-16).



Figure I-16. Sac d'échantillonnage en Tedlar[®] et pompe de prélèvement.

Ces techniques simples, transportables et peu chères permettent de collecter les COVs dans un volume d'air connu et contrôlé. Cependant, les COVs présents dans le volume d'air prélevé sont souvent à l'état de trace et par conséquent, ces échantillonnages manquent de sensibilité. Il est nécessaire d'utiliser des méthodes permettant une concentration des COVs lors de l'extraction, cette dernière nécessite donc un piège sous forme d'une phase solide (support adsorbant ou absorbant). Les techniques d'extraction en espace de tête (HS: Headspace) par enrichissement (piège) peuvent être divisées en deux grandes familles : techniques passives/statiques (Tableau I-8) et dynamiques (Tableau I-9).

I.6.2.1. Méthodes passives

Lors d'un échantillonnage passif, les COVs émis par la plante diffusent librement du milieu échantillonné à un milieu collecteur. Les molécules sont retenues sur un support absorbant (ingéré dans un liquide ou solide) ou adsorbant (fixé à la surface d'un solide généralement) placé dans l'environnement proche de la plante (Tableau I-8).

• Microextraction sur phase solide ou SPME

La microextraction sur phase solide (SPME: Solid Phase Microextraction) est une technique de concentration des composés volatils. Les composés sont piégés sur ou dans une phase stationnaire greffée sur une fibre en acier inoxydable, elle-même placée à l'intérieur d'une aiguille creuse amovible (Figure I-17).



Figure I-17. Extraction par SPME : 1, Extraction sur plante ; 2, Dispositif.

La SPME est souvent employée pour son efficacité, sa simplicité et sa sensibilité [144, 145]. Il existe différents types de phases stationnaires, de polarités variées, composées de polymères tels que le polydiméthylsiloxane (PDMS), le polyacrylate (PA) ou le polyéthylène glycol (CW : carbowax) et de polymères poreux tels que le divinylbenzène (DVB) ou le carboxen (CAR) fixés à la fibre à l'aide du PDMS.

Tableau I-8. Techniques passives d'extraction de COVs.

Technique d'extraction	Avantages	Inconvénients	Fournisseurs
Microextraction sur phase solide [144] Piston Support pour la fibre Guide de l'aiguille Fibre et phase stationnaire Plante Aiguille Chambre d'enfermement (en matière inerte)	 Simple Sensible Rapide Réutilisable 	 Quantification Fragilité Prix des fibres 	Sigma-Aldrich (http://www.sigmaaldrich.com); Restek (http://www.restek.com)
Extraction par sorption en espace de tête [146]	 Sensible Réutilisable 	 Quantification Prix Nombre de phases limité Désorption thermique et injecteur PTV 	Gerstel (http://www.gerstel.com)
Extraction par sorption sur matériau monolithique [147] Chambre d'enfermement (en matière inerte) Plante Plante	• Simple • Rapide	 Non réutilisable Prix 	Hichrom (http://www.hichrom.com)
Microextraction sur goutte solvant [148] Seringue Chambre d'enfermement (en matière inerte) Plante	 Simplicité du principe Prix 	 Sensibilité Répétabilité et reproductibilité Fragilité de la goutte 	Fabrication au laboratoire
Extraction à l'aide de tube de silicone contenant du PDMS [149] Récipient de piégeage Tube de silicone contenant du PDMS Plante	• Prix	 Sensibilité Répétabilité et reproductibilité Non commercial 	Fabrication au laboratoire
Extraction par contact d'une bande adhésive de PDMS [150] Bande adhésive de PDMS Support végétal	• Simple • Rapide	 Sensibilité Répétabilité et reproductibilité Non commercial 	Fabrication au laboratoire

Lors de l'extraction, les composés sont retenus sur/dans la phase stationnaire jusqu'à l'établissement d'un équilibre entre la phase solide et/ou liquide et la phase gazeuse. La durée d'échantillonnage peut varier de quelques minutes à plus d'une heure. Les molécules piégées sur/dans la phase stationnaire sont ensuite thermodésorbées dans l'injecteur de la GC, généralement de type SSL (Split/Splitless) muni d'un liner adapté (faible diamètre : 0,75 mm) ou désorbés à l'aide d'un solvant. Cette technique de microextraction sur phase solide, réalisable en laboratoire et en champ, a été choisie notamment pour étudier les composés volatils émis par les racines de brocoli (*Brassica oleracea* L.) suite à l'attaque de larves de *Delia radicum* L. [151].

• Extraction par sorption en espace de tête ou HSSE

L'extraction par sorption en espace de tête (HSSE: Headspace Sorptive Extraction), technique moins fréquemment employée, est une évolution de la SPME qui consiste à utiliser un barreau magnétique introduit dans un support en verre et recouvert ou contenant une phase stationnaire servant à extraire (ou piéger) les COVs [146]. Cette technique a été mise au point dans le but d'avoir un volume de phase stationnaire plus important et un support (barreau magnétique) plus solide que dans le cas d'une fibre SPME [152]. Les barreaux aimantés, plus connus sous le nom de Twister™ ou Dual Twister™, se placent au-dessus de la plante ou directement en contact avec celle-ci (Figure I-18). En effet, les Twister™ peuvent être positionnés et maintenus sur les faces inférieures et supérieures d'une feuille ou d'une foliole.



Figure I-18. Extraction par sorption sur barreau magnétique : 1, Extraction sur plante ; 2, Schémas des barreaux.

Une fois l'équilibre établi entre les phases, le barreau est retiré puis transféré dans un système de désorption thermique associé à un injecteur à température contrôlée (PTV: Programmed Temperature Vaporization), suivi du transfert des analytes au chromatographe en phase gazeuse. L'utilisation de ces barreaux a pu par exemple mettre en évidence des différences d'émissions de composés volatils entre les épidermes foliaires adaxiaux et abaxiaux de tomates (*Solanum lycopersicum*) étudiés suite à l'infection par des acariens (*Tetranychus urticae*) et des pucerons (*Myzus persicae*) [153].

• Extraction par sorption sur matériau monolithique ou MMSE

Les MonoTrap[™] (MMSE: Monolithic Material Sorption Extraction) correspondent à des disques ou des cylindres composés d'une surface de silice poreuse, d'une phase adsorbante (PDMS ou octadécylsilane) et éventuellement du charbon actif présent à l'intérieur et à l'extérieur de la structure. Lors du passage des COVs à travers la surface monolithique, les composés sont piégés sur la phase adsorbante fixée à la surface de silice ou par le charbon actif [147]. L'adsorption des COVs est réalisée en espace de tête par contact direct du solide ou par l'intermédiaire d'une tige maintenue au-dessus de l'échantillon solide. La désorption par solvant des COVs du support solide est considérée comme efficace en raison de la perméabilité des supports monolithiques poreux. La désorption thermique est également possible même si seuls les MonoTrap[™] en forme de cylindre sont adaptés. Cependant, les disques et cylindres ne sont pas réutilisables, ce qui rend la technique moins abordable. À la suite de la désorption, les composés sont principalement analysés en GC.

Cette technique récente et facile à utiliser, est peu employée en écologie chimique. Elle a cependant servi à étudier, en espace de tête, les COVs toxiques sur les adultes de la mouche blanche (*Bemisia tabaci*), lorsque ces derniers sont exposés aux vapeurs des HE de feuilles de *Lippia multiflora* et de *Melaleuca leucadendron* [154]. Par cette seule étude réalisée sur des HE, aucunes conclusions sur les performances de la MMSE ne peuvent être établies. Des études supplémentaires sont à envisager pour avoir plus de recul quant à l'efficacité de cette technique sur l'extraction de COVs émis par des plantes.

• Techniques émergentes

Les progrès des méthodes de dépôt ou greffage de phase adsorbantes/absorbantes sur différents types d'objets ont conduit aux développements d'autres techniques d'échantillonnage actuellement peu utilisées : la microextraction sur goutte de solvant, l'extraction à l'aide de tube de silicone contenant du PDMS ainsi que l'extraction par contact d'une bande adhésive de PDMS. La microextraction sur goutte de solvant (SDME: Single Drop Micro Extraction), comme son nom l'indique, consiste à utiliser une goutte de solvant pour piéger les COVs. Après le piégeage, la goutte est ramenée dans la microseringue, puis introduite directement dans les instruments d'analyses qualitatives et quantitatives. Peu d'applications ont été réalisées à l'aide de ce dispositif en raison de la forte fragilité et d'un faible facteur d'enrichissement de la goutte [148].

Une autre manière plus utilisée pour concentrer des COVs est d'effectuer une adsorption en utilisant une phase adsorbante. Un dispositif peut être fabriqué au laboratoire en utilisant un tube de silicone contenant la phase adsorbante de PDMS [149]. L'analyse se fait principalement par désorption thermique associée à la chromatographie en phase gazeuse en plaçant le tube de silicone dans un tube de désorption thermique vide mais également par désorption à l'aide d'un solvant adapté. Ce dispositif a notamment été utilisé pour l'étude de COVs émis par les larves de *Manduca sexta* qui sont connues pour relâcher de la nicotine ingérée lors de leur alimentation sur leur plante hôte *Nicotiana attenuata* [155]. Cependant,

la faible sensibilité et l'observation de pics de silicone sur les chromatogrammes lors de l'analyse sont des inconvénients majeurs pour cette technique peu coûteuse.

Il existe également des bandes adhésives de PDMS à placer directement en contact (DC-STE: Direct Contact-Sorptive Tape Extraction) avec la surface biologique. Après l'échantillonnage, les bandes de PDMS sont généralement placées dans des tubes de désorption thermique et soumis à ce type de désorption. La récupération des analytes peut également se faire par un solvant adapté tel que le dichlorométhane ou l'acétonitrile. Les bandes de PDMS ont été appliquées pour la première fois *in vivo* dans le but d'identifier les COVs émis par les feuilles de haricots (*Phaseolus lunatus*) suite aux blessures induites par les larves de *Spodoptera littoralis* [156]. Ce principe innovant serait intéressant à approfondir en raison de sa simplicité et de sa rapidité. Cependant, pour toutes ces méthodes émergentes, les problèmes de répétabilité et quantification ne sont pas adpatés pour des études en écologie chimique.

I.6.2.2. Méthodes dynamiques

L'échantillonnage dynamique déplace l'équilibre échantillon/phase gazeuse en faveur de cette dernière par l'utilisation d'un flux continu de gaz. En effet, les composés sont entraînés par le courant d'air provenant d'une pompe, ce qui déplace l'équilibre et donc dirige les composés vers le piège. L'intérêt est alors de piéger une quantité plus importante de COVs. Pour contrôler les flux et quantifier les taux d'émission de COVs, des débitmètres peuvent être associés au dispositif (Tableau I-9).

• Espace de tête dynamique ou DHS

Les techniques d'extraction en espace de tête dynamique (DHS : Dynamic Headspace) sont souvent utilisées pour piéger les COVs par adsorption sur un polymère (éthylvinylbenzènedivinylbenzène, divinylbenzènevinyl pyrrolidone, oxyde de 2,6-diphényl-p-phénylène, styrène-divinylbenzène, etc.), du noir de carbone graphité, du tamis moléculaire de carbone ou du charbon actif [144]. En pratique, la phase la plus utilisée est le polymère d'oxyde de 2,6diphényl-p-phénylène, appelée Tenax. Le piège contenant l'adsorbant est constitué d'un tube en métal ou en verre maintenu proche de la plante et relié à une pompe pour permettre le piégeage des COVs (Figure I-19).



Figure I-19. Extraction par DHS : 1, Piège ; 2, Piège et pompe (Reproduction avec l'autorisation de la société MARKES).
Tableau I-9. Techniques dynamiques d'extraction de COVs.



Il est possible de combiner l'utilisation de plusieurs phases pour cibler plus de molécules. La combinaison de plusieurs phases adsorbantes - noir de carbone graphitisé (Carbotrap et Carbotrap C) et tamis moléculaire de carbone (Carbosieve S 111) - a été testée pour étudier les hydrocarbures de l'air [159]. En effet, leur piégeage est difficile en raison notamment de leur faible concentration. Or, par l'utilisation des trois phases, il a été possible de retenir une plus large gamme de composés hydrocarbonés (C₃ à C₁₄).

L'extraction peut se réaliser au sein d'un espace clos pour contrôler les paramètres environnementaux. L'utilisation d'un piège Tenax a servi à comparer par exemple les composés volatils émis par des feuilles de pomme de terre intactes ou présentant des lésions [160]. Une feuille de pomme de terre intacte produit de très petites quantités de sesquiterpènes alors qu'après blessure, la libération de COVs tels que le β -caryophyllène, le *(E)*- β -farnésène, le germacrène-D, ou le β -bisabolène est augmentée.

Après échantillonnage, les COVs sont désorbés à l'aide d'un solvant (dichlorométhane, acétone ou éther diéthylique) ou thermodésorbés. Cette étape de désorption permet d'extraire les COVs de la phase adsorbante, et ainsi de les analyser en chromatographie en phase gazeuse pour les séparer et les identifier (GC-MS/FID). La thermodésorption est préférentiellement utilisée car elle évite la présence de pics de solvant mais nécessite d'utiliser un thermodésorbeur et un injecteur PTV.

Les pièges peuvent être également associés aux appareillages de type Licor[®] qui sont utilisés habituellement en écologie pour mesurer la photosynthèse et les échanges gazeux [161]. Par détournement, l'appareil peut ainsi servir à piéger les COVs de façon contrôlée. Cependant, le coût de l'appareil ainsi que son poids sont des contraintes à prendre en compte dans l'objectif de réaliser des expériences sur le terrain.

• Le système « SnifProbe »

Le système « SnifProbe » utilise des petites pièces de colonnes capillaires (15 mm de long et 0,53 mm de diamètre) ou de colonnes poreuses (PLOT : Porous Layer Open Tubular) contenant un polymère poreux permettant l'échantillonnage de gaz ou de composés volatils présents dans l'atmosphère [157].



Figure I-20. Système « SnifProbe » (Reproduction avec l'autorisation de la société Aviv Analytical).

Une pompe, placée dans un appareil fermé facilement transportable, est reliée à la colonne pour aspirer les COVs (Figure I-20). Il suffit d'approcher l'appareil de la source produisant les COVs pour les piéger. La portion de colonne est placée à l'aide d'une pince dans un microflacon en verre introduit directement par le système Thermal Separation Probe (TSP) dans l'injecteur de GC pour la désorption thermique des COVs. L'introduction de la colonne dans le micro-vial ainsi que le placement de ce dernier dans le système TSP peuvent être des étapes délicates puisqu'il faut éviter de casser la portion de colonne. Aucune application en écologie chimique utilisant le dispositif « SnifProbe » n'a été référencée à ce jour. Etant donné le peu d'applications utilisant cet appareil pour étudier les COVs, sa qualité ne peut pas être évaluée.

• Extraction en tube ou ITEX

Le système d'extraction en tube (ITEX : In-tube extraction) utilise une aiguille reliée à une seringue headspace. Lors de l'extraction, un pompage est réalisé à plusieurs reprises par la seringue qui aspire et entraîne les COVs à travers un tube en acier inoxydable placé entre l'aiguille et le corps de la seringue, et contenant la phase adsorbante ou absorbante [158]. La seringue et le tube sont entourés d'un système de bloc chauffant pour éviter la condensation dans la seringue et faciliter la désorption thermique. Les COVs sont donc piégés par la phase stationnaire, désorbés à l'aide d'un flux de gaz inerte dans le système de chauffage qui entoure le tube et envoyés dans l'injecteur de GC. Ce système nécessite un pompage régulier et automatique, ce qui revient à utiliser en laboratoire un automate de type combiPAL qui n'est pas applicable en extérieur par exemple en plein champ.

• Extraction à travers une aiguille

Le terme d'extraction à travers une aiguille présenté dans le Tableau I-9 reprend plusieurs techniques basées sur ce principe et essentiellement utilisables en laboratoire : l'extraction dynamique en phase solide (SPDE: Solid-phase dynamic extraction) possédant une aiguille creuse dont la paroi interne est recouverte d'adsorbant [162], l'extraction dynamique dans une aiguille (INDEx: Inside needle dynamic extraction) se basant sur l'adsorption en surface intérieure de l'aiguille [163], et l'adsorption à l'intérieur de l'aiguille creuse contenant une colonne capillaire ou un revêtement de carbone (INCAT: Inside needle capillary adsorption trap) [164]. De même que pour l'ITEX, c'est un système de pompage automatique qui permet le transfert des molécules vers la phase adsorbante. En revanche, la désorption thermique des COVs est réalisée en introduisant directement l'aiguille dans l'injecteur de GC.

I.6.2.3. Bilan

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de l'intérêt scientifique pour l'écologie chimique a contribué au développement de nouvelles techniques d'échantillonnage dans le but d'améliorer notamment la facilité d'utilisation, la sensibilité et la réduction du coût. Néanmoins, la tendance à l'automatisation de certaines de ces techniques fait qu'elles ciblent principalement des applications en laboratoire. Globalement, les techniques passives sont souvent privilégiées face à la difficulté de mise en place et le coût du matériel pour les extractions en espace de tête dynamique. Ainsi, la SPME est couramment utilisée (Figure I-21).



Figure I-21. Méthodes de piégeage des COVs les plus couramment utilisées. Les chiffres représentent le nombre de publications trouvées après recherche sur « SciFinder » en entrant les termes : "volatil" et "plant" accompagnés de la méthode d'extraction.

En utilisant les termes "volatil" et "plant" accompagnés de la méthode d'extraction, 66 % des études font références à l'utilisation de la SPME (202 études reportées dans SciFinder) contrairement à seulement 2 % utilisant l'extraction DHS (5 références). Les techniques DHS sont toutefois plus intéressantes en raison de leur forte sensibilité, de la réalisation de multiprélèvements et de la quantification des molécules.

Cette partie donne néanmoins un aperçu des méthodes d'échantillonnage de COVs pouvant être appliquées en écologie chimique avec leurs avantages et inconvénients, sachant que le choix de la technique d'échantillonnage se fait en fonction de l'étude puisque suivant les plantes, leur âge, la saison ou les parties de plantes étudiées, les émissions en COVs varient [67] mais également en fonction de la question scientifique et des conditions de travail (laboratoire, serre ou champ).

I.7. Méthodes analytiques pour étudier les COVs

Pour analyser les composés volatils ou semi-volatils, la chromatographie en phase gazeuse (GC: Gas Chromatography) est la méthode la plus appropriée (Figure I-22). Un chromatographe en phase gazeuse est composé d'un injecteur, d'une colonne composée d'une phase stationnaire dans laquelle les molécules du mélange à analyser sont séparées. Il est associé à un ou plusieurs détecteurs [165, 166]. Les molécules sont entrainées par un flux de gaz vecteur inerte ; c'est la phase mobile. L'appareillage est muni d'un four permettant de réguler les températures appliquées sur la colonne. Une diminution de la température augmente l'interaction entre les molécules et la phase stationnaire et conduit à un temps de rétention dans l'appareil plus long. Le plus souvent, un gradient de température est utilisé pour séparer les molécules de mélange complexe.



Figure I-22. Représentation simplifiée d'un chromatographe.

I.7.1. Injecteur

L'injecteur permet le transfert par désorption des molécules volatiles présentes dans l'échantillon de la phase ab/adsorbante dans la colonne par un gaz vecteur. Il existe différents injecteurs et types d'injection.

Trois principaux injecteurs existent [167] :

→ L'injecteur de type split (avec diviseur de flux)/splitless (sans diviseur de flux) est le plus généralement utilisé. Le mode split est souvent employé pour les échantillons concentrés. L'échantillon volatilisé est divisé en deux fractions par une vanne de fuite dont seule la plus petite fraction est envoyée vers la colonne par le gaz vecteur, l'autre partie étant éliminée. Le mode splitless est réservé aux échantillons dilués puisque tout l'échantillon est envoyé dans la colonne, la vanne de split est fermée

pendant un temps fixé. Le mode *splitless* est souvent utilisé en écologie chimique puisque les échantillons sont rarement concentrés.

- → L'injecteur sur colonne (on-column) est utilisé pour les composés thermolabiles ou pour injecter un large volume. Dans ce cas, l'échantillon est injecté directement dans la colonne.
- → L'injecteur à température programmable (PTV: Programmed Temperature Vaporizer) est utilisé comme un injecteur de type *split/splitless* en faisant varier la température de la chambre d'injection.

Dans le cas où les COVs sont désorbés par une unité automatique de désorption thermique (ATD: Automated Thermal Desorption) (Figure I-23 (A)), deux étapes sont nécessaires avant l'injection : la désorption primaire qui permet le transfert des composés du tube de prélèvement vers une chambre de concentration composée d'adsorbant (piège à froid) et la désorption secondaire qui transfère les composés de la chambre froide vers la colonne chromatographique par une ligne de transfert.



Figure I-23. Photo d'un ATD-GC-MS. (A) : thermodésorbeur, (B) : chromatographe en phase gazeuse (séparateur), (C) : spectromètre de masse (détecteur).

I.7.2. Colonnes

La séparation des COVs se fait généralement sur colonnes capillaires composées de silice fondue, contenant la phase stationnaire sur leur paroi interne. Les principales phases stationnaires peuvent être de type apolaire principalement composées de polymères siliconés dérivés du polydiméthylsiloxane, polaires à base de polyethylène glycol (PEG) ou chirales contenant des cyclodextrines hydrophobes pour séparer les molécules chirales [168].

De nouvelles techniques de GC se sont développées dans le but d'améliorer la résolution analytique ainsi que l'obtention de plus basses limites de détection.

Le terme de fast-GC est employé lors de configurations utilisant des colonnes de petites tailles avec un diamètre interne et une épaisseur de films réduits comparées aux colonnes habituellement utilisées ce qui permet de réaliser des analyses rapides (5 à 15 min) [169]. Ce

type de techniques apporte un gain de temps, mais la capacité de la colonne reste faible et ne permet pas l'injection de grande quantité d'analytes.

Lorsque les mélanges à analyser sont trop complexes, des systèmes de GC bidimensionnelle (GCxGC et GC-GC) ont été mis en place pour séparer successivement les composés sur deux colonnes de nature différentes. Cette technique nécessite l'installation d'un modulateur (valves, circuit de pression, piège cryogénique) entre les deux colonnes [170].

I.7.3. Détecteurs

Pour détecter ces composés, le chromatographe en phase gazeuse est muni d'un détecteur. Différents types de détecteurs existent dont certains sont sensibles à tout type de composés alors que d'autres sont spécifiques à certains composés. Les plus utilisés en écologie chimique sont le détecteur de masse, le détecteur à ionisation de flamme et le détecteur électroantennographique.

• Détecteur de masse (MS: Mass spectrometry) [144]

Le couplage GC-MS est le plus utilisé car il permet d'apporter des informations structurales et potentiellement l'identification des molécules. Le spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation qui génère des ions, d'un ou plusieurs analyseurs permettant de séparer les ions produits selon leur rapport m/z, ainsi que d'un détecteur qui détecte les ions et amplifie le signal.

Le mode d'ionisation le plus courant est l'ionisation électronique (EI : Electron ionization) et consiste à bombarder chaque composé par un faisceau d'électrons. Les ions issus de chaque molécule sont séparés selon leurs rapports masse/charge (m/z) au sein d'un analyseur généralement de type quadripolaire [169].

Le détecteur conduit au spectre de fragmentation de chaque composé. Le chromatogramme contenant les composés est obtenu à partir d'un courant ionique total (TIC). Chaque molécule possède son propre spectre de masse contenant les rapports m/z des ions détectés. Le spectre est alors comparé à des bibliothèques de spectres pour identifier la molécule.

Lorsque le couplage GC-MS n'est pas suffisant pour permettre l'identification de tous les composés, la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS) peut être employée pour augmenter la sensibilité, atteindre une résolution permettant un haut degré d'exactitude de masse et donc une identification plus précise des métabolites.

• Détecteur à ionisation de flamme (FID: Flame Ionisation Detector) [144]

Pour quantifier les molécules, un détecteur à ionisation de flamme est souvent utilisé en complément du détecteur MS. Il repose sur l'utilisation d'une flamme, alimentée par un mélange H₂/air, dans laquelle les molécules se dégradent pour former des radicaux qui s'oxydent et produisent des ions, particules chargées. C'est le signal électrique provoqué par les ions qui est mesuré, ce qui permet une quantification absolue.

• Détecteur électroantennographique (EAD: Electroantennography Detector) [171]

Ce détecteur se compose de deux électrodes placées à chaque extrémité de l'antenne, de la tête ou de l'insecte afin de mesurer la somme des potentiels récepteurs de l'ensemble des cellules sensorielles (Figure I-24). Lorsque les COVs sont détectés par les récepteurs de l'insecte, une différence de potentiel électrique se produit alors que pour les composés sans effet, le facteur de réponse électrique reste inchangé. La différence de potentiel électrique produit un courant qui est mesuré par une électrode ; l'ensemble de ces potentiels s'enregistre sous la forme d'un électro-antennogramme.



Figure I-24. Représentation simplifiée d'un chromatographe couplé à l'électro-antennographie (GC-EAD) et à un détecteur FID.

Il existe d'autres couplages plus spécifiques tels que le couplage GC-O (GC couplée à un olfactomètre) [172], GC-NPD (GC muni d'un détecteur azote-phosphore), GC-PFPD (GC muni d'un détecteur à photométrie de flamme), GC/IRTF (GC couplée à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) ou encore GC-ECD (GC muni d'un détecteur à capture d'électrons) qui sont moins utilisés en écologie chimique [173].

I.7.4. Nouvelles méthodes de détection directe de gaz

Des méthodes combinant détection et analyses en temps réel telles que la spectrométrie de masse par réaction de transfert de protons (PTR-MS) et des systèmes à base de laser sont utilisés pour étudier l'évolution des émissions en COVs en quelques secondes sur le terrain. Par ces méthodes rapides, il n'y a pas d'étapes de préconcentration ou de désorption thermique. Cependant, ces dispositifs ne piègent que les molécules très volatiles et seule la masse des ions produits est déterminée ce qui ne donne pas assez d'informations pour identifier le lou les composé(s) [174].

PTR-MS (Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry)

La PTR-MS est utilisée pour analyser les COVs dans l'air ambiant en temps réel. Cette technique de chimie analytique utilise des ions hydronium (H_3O^+) pour ioniser les COVs présents dans la phase gazeuse [39] (Figure I-25 (A)). Les ions produits dans cette réaction sont détectés par un analyseur de masse. Sur la Figure I-25 (B), l'ion moléculaire 204 caractéristique des sesquiterpènes est visible sur le spectre de masse du β -caryophyllène. Les principaux avantages sont la sensibilité de la technique ainsi que l'application directe sans étape de concentration des COVs.



Figure I-25. Schéma du dispositif PTR-MS (d'après [175]) (A) et exemple du spectre de masse du β -caryophyllène obtenu (extrait de [176]) (B).

D'Auria *et al.* (2007) ont mis en évidence grâce à un PTR-MS des différences d'émissions entre des feuilles d'*Arabidopsis* endomagées par des larves de *Spodoptera exigua* et des feuilles non endommagées. Contrairement aux feuilles saines, les plantes infectées émettent du (*Z*)-3-hexénal, du (*Z*)-3-hexène-1-ol et de l'acétate de (*Z*)-3-hexène-1-yl. Pour suivre l'évolution de ces émissions en fonction du temps, un appareil de PTR-MS mesurant les masses des ions a été utilisé [177]. Les composés (Z)-3-hexène-1-ol et l'acétate de (Z)-3-hexène-1-yl posent des difficultés pour le calcul de leurs abondances car ils génèrent deux ions fragments identiques (masse 55 et masse 83). Pour remédier à ce problème, un facteur de correction a été calculé en utilisant des mélanges de rapports connus des deux composés. Dans cette étude, le dispositif PTR-MS n'a été utilisé qu'en complément de la GC-MS et uniquement pour suivre l'évolution de trois composés au cours du temps.

• Spectroscopie d'absorption infrarouge par laser

Une molécule volatile qui absorbe la lumière du rayonnement laser passe dans un état excité. Cette absorption provoque une diminution de l'intensité de la lumière du laser, qui est directement quantifiée par spectroscopie d'absorption. La spectroscopie laser est très spécifique et apporte une grande précision puisque la molécule donne une absorption unique et spécifique [178].

Les techniques de PTR-MS et de spectroscopie d'absorption infrarouge peuvent fournir de nouvelles perspectives dans l'étude en temps réel d'émission de COVs des plantes. Cependant, ces méthodes sont limitées à la détection de composés légers, et la distinction des isomères est impossible. De plus, la présence de nombreux fragments rend l'interprétation des spectres de masse complexe. Pour pallier le problème d'identification des isomères et permettre la mesure précise d'un mélange de COVs émis, des standards de ces COVs devraient être analysés au préalable.

I.8. <u>Traitement des données</u>

Les nombreux signaux obtenus par les méthodes d'analyse doivent être explorés par des méthodes de traitement de données. En général ce traitement de données est constitué de plusieurs étapes qui permettent de passer des profils chromatographiques (signaux) à l'identification de biomarqueurs.

I.8.1. Prétraitement des données [179]

Le prétraitement des données consiste à convertir les signaux bruts (représentation graphique) en données numériques. Il comprend plusieurs étapes telles que la détection des pics, l'alignement, l'intégration et la normalisation pour obtenir des données utilisables pour l'analyse statistique. Ainsi, l'ensemble des signaux détectés est représenté dans une matrice compatible avec les logiciels d'analyses statistiques. Il existe plusieurs types de logiciels en libre accès ou commerciaux permettant la détection automatique de signaux de chaque échantillon (Tableau I-10). En fonction des données extraites à partir des profils chromatographiques, les méthodes statistiques employées ne sont donc pas les mêmes. Ces données peuvent être exprimées sous trois formats différents : données binaires (présence/absence du composé), données de concentration du composé ou données de proportions relatives du composé dans l'échantillon.

Logicial	Accès	Format des	Traitament des dennées	Normalisation	Analyses
Logiciei	Acces	données brutes	maitement des données	Normalisation	statistiques
IMP [110]	Logiciel commercial	XIS	Nettovage des données	Oui	univariées et
	Logicier commercial	XL5	Nettoyage des donnees	Our	multivariées
		mzXMI	Correction ligne de base et bruit de fond		univariées et
Metabo-Analyst [180]	Logiciel en ligne gratuit	NetCDE	Alignement	Oui	multivariées
		Netebr	Annotation		munivariees
			Correction ligne de base et bruit de fond		
Metalign [181]	Logiciel gratuit	NetCDF	Déconvolution	Oui	Non
			Alignement		
		mzYMI	Correction ligne de base et bruit de fond		
MZMine [182]	Logiciel en ligne gratuit	NetCDF	Déconvolution	Oui	multivariées
			Alignement		
	Logiciel gratuit à télécharger	NetCDF	Correction ligne de base et bruit de fond		univariáos ot
R [179]			Alignement	Oui	univariees et
			Annotation		munivariees
SIMCA-P [107]	Logiciel commercial	XLS	-	Oui	multivariées
Statistica [111]	Logiciel commercial	VIS		Oui	univariées et
	Logicier commercial	AL5	-	Our	multivariées
			Correction ligne de base et bruit de fond		
Workflow4Metabolomics	Logicial on ligno gratuit	NotODE	Déconvolution	Oui	univariées et
Galaxy [183]	Logiciel en lighe gratuit	NEICDF	Alignement	Oui	multivariées
			Annotation		
		mzYMI	Correction ligne de base et bruit de fond		univarióos (tost T
XCMS [184]	Logiciel en ligne gratuit		Déconvolution	Non	
		NEICDF	Alignement		ANOVAJ
YI Stat [112]	Logiciel commercial	YI S	Déconvolution	Oui	univariées et
	LOGICIEI COMMERCIAI	ALJ	Deconvolution	Jui	multivariées

Tableau I-10 : Principaux logiciels pour réaliser le traitement des données de GC-MS en écologie chimique.



Figure I-26. Etapes d'extraction, d'alignement en fonction des temps de rétention (tr) et de transformation des données, selon les valeurs xi et xj du vecteur de données (avec D, le nombre total de valeurs).

Après alignement des temps de rétention réalisé par des logiciels, il est souvent nécessaire de transformer les données avant les analyses statistiques. Des transformations permettant de stabiliser les variances des données sont appliquées sur la matrice contenant les variables en lignes (temps de rétention) et, en colonne, les intensités (aires des pics) de chaque variable dans un échantillon donné (Figure I-26).

Les données peuvent également être centrées pour ajuster et comparer des métabolites dont les intensités moyennes sont très différentes. De plus, une transformation par l'utilisation du logarithme est souvent employée dont la plus utilisée est la transformation logarithmique centrée *clr* (centered log-ratio) [185]. Cette transformation permet, en général, de rapprocher des valeurs extrêmes pour obtenir une distribution des variables moins large. La fonction *clr* transforme les données en prenant le logarithme des valeurs du vecteur de données (xi) en fonction de la moyenne géométrique de x qui correspond à la formule : $\frac{1}{D} \times \sum_{j=1}^{D} x_j$. Si le jeu possède des données absentes, l'ajout d'une petite constante à toutes les valeurs pour obtenir des valeurs non nulles est réalisé en amont.

I.8.2. Analyses statistiques

I.8.2.1. Analyses univariées

Le but des analyses univariées est d'étudier les variables en fonction d'une seule métadonnée telle que l'abondance ou le niveau d'infection. Il existe deux principaux tests employés : les tests paramétriques nécessitant une distribution normale des échantillons et les tests non paramétriques, moins puissants mais applicables dans tous les cas (Figure I-27) [186].

Le test T de Student est un test paramétrique utilisé pour comparer deux moyennes (les tests de Wilcoxon et Mann-Whitney étant les équivalents en tests non paramétrique). L'hypothèse nulle correspond à l'égalité des deux moyennes.

L'analyse de variance (ANOVA: ANalysis Of VAriance) correspond à la généralisation du test T de Student à plus de deux groupes. L'hypothèse nulle se traduit donc par l'égalité des moyennes de tous les échantillons.



Figure I-27. Schéma des principales analyses univariées.

I.8.2.2. Analyses multivariées [179]

Pour étudier plusieurs variables, des analyses multivariées sont réalisées. Ces analyses peuvent être de deux types :

• Analyses non supervisées aussi appelées analyses descriptives. Ces analyses ne tiennent pas compte de l'appartenance des échantillons à des groupes.

L'ACP (Principal Component Analysis) est une méthode de réduction des variables qui consiste à décrire un ensemble de données (individus et variables) dans un espace à 2 ou 3 dimensions et permet de visualiser des tendances de répartition. Dans l'exemple en Figure

I-28 (a), l'objectif de l'étude était de comparer les émissions en COVs de 17 échantillons d'orchidées selon la couleur des fleurs (blanc ou violet). Chaque point représente un échantillon.

Les données sont représentées selon des vecteurs non corrélés (composantes principales, Comp.) en fonction de la variance des données, la première composante étant supérieure à la seconde et ainsi de suite. Le but de l'ACP est de visualiser si la structuration des échantillons est homogène ou au contraire de détecter des échantillons aberrants (« outliers »). La qualité de l'ACP est évaluée en fonction de la proportion de la variance totale expliquée par les premières composantes. D'après l'exemple de la Figure I-28 (a), les composantes 1 et 2 expliquent 46 % de variance des données, ce qui est satisfaisant pour indiquer que les émissions en COVs sont différentes en fonction de la couleur des fleurs.



Figure I-28. Exemples d'ACP (a) et de PPLS-DA (b) (extraits de [179])

• Analyses supervisées. Ces analyses se focalisent sur la variabilité intergroupe (séparation des échantillons suivant des groupes) et ont pour objectif de mettre en avant les variables à l'origine des discriminations du modèle.

La PLS-DA (Partial Least Squares – Discriminant Analysis) est une méthode de régression qui permet d'expliquer la répartition d'une ou plusieurs variables en fonction d'une matrice de variables expérimentales. Elle est souvent utilisée dans les études métabolomiques pour classer des échantillons et déterminer des biomarqueurs. Une interprétation visuelle peut se faire en observant la répartition des échantillons dans les ellipses d'intervalle de confiance (95%) et pour valider le modèle, des validations croisées ainsi que des tests de permutation basés sur la validation croisée ont été réalisés. La qualité du modèle est évaluée par le pourcentage d'erreur de classification (NMC: number of misclassifications) qui indique les échantillons qui sont mal classés par le modèle et la *P*-valeur (*p*-value: probability value). Le seuil de significativité est généralement fixé à 0,05 dans la plupart des études métabolomiques. Cela signifie qu'avec une *P*-valeur < 0,05, l'hypothèse H0 (aucune différence entre les deux classes)

peut être rejetée et la différence observée entre les groupes est statistiquement significative [187]. Dans l'exemple en Figure I-28 (b), le taux d'erreur de classification est d'environ 7 % et la performance du modèle a été confirmée par le rejet de l'hypothèse H0 (*P*-valeur = 0,001). Il y a donc une importante différence entre les deux groupes (fleurs blanches et fleurs violettes) modélisés par powered PLS-DA (PPLS-DA), extension de PLS-DA ayant une meilleure puissance et avec une erreur de classification diminuée.

A partir des analyses discriminantes, des scores VIP (VIP: Variable Importance in Projection) peuvent être calculés. Ils estiment l'importance de chaque variable dans la construction du modèle statistique employé. Plus le score VIP est élevé, plus la variable considérée est discriminante. Généralement, une variable avec un score VIP proche ou supérieur à 1 est considérée comme importante.

I.9. Identifications des COVs et essais biologiques

I.9.1. Étapes d'identification [169]

L'étape d'identification de tous les composés peut s'avérer longue et difficile. Dans le cas d'une approche non ciblée, si le nombre de composés est important, l'identification se fait uniquement sur les marqueurs mis en avant par les analyses discriminantes.

Pour identifier les COVs séparés en GC, des **bibliothèques de spectres de masse** sont disponibles. Ces bases de données commerciales comme la NIST (National Institute of Standards and Technology) ou Wiley, et aussi internes au laboratoire, regroupent les spectres de masse de nombreux composés et facilitent l'identification des métabolites.

Pour obtenir une meilleure identification, indépendante des paramètres du système analytique, des **indices de rétention** sont calculés. Pour les déterminer, on injecte un mélange d'alcanes, molécules de référence, selon les mêmes conditions que lors de l'injection de l'échantillon puis on applique la formule définie par Van den Dool et Kratz (Figure I-29) [188].

$$Ix = 100n + 100 \frac{(tx - tn)}{(tn + 1 - tn)}$$

Figure I-29. Formule de calcul de l'indice de rétention I du composé x en fonction de l'alcane à n carbone, selon Van den Dool et Kratz.

Une identification correcte nécessite de faire une correspondance entre les spectres de masse et les indices de rétention obtenus après injection des échantillons sur **deux colonnes ayant des polarités différentes**.

Enfin, l'injection de standards peut être réalisée pour confirmer l'identification.

En l'absence de correspondance avec les banques de données, l'identification des molécules requiert l'étude de la **fragmentation**. Si cela s'avère insuffisant, il est nécessaire de passer par une étape de purification de la molécule par chromatographie préparative. Cette étape est

généralement coûteuse en temps et en matière première. Une fois la molécule purifiée, l'élucidation structurale peut se faire par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). L'étape d'**isolement de molécule** est rarement effectuée en écologie chimique en raison des faibles quantités d'échantillons traités.

I.9.2. Essais biologiques et validation

L'utilisation des COVs comme signaux chimiques dans la protection des cultures implique de savoir s'ils peuvent être perçus par les insectes, tests habituellement réalisés par GC-EAD [189]. Même si cette méthode donne des résultats positifs sur la perception d'un composé par le système olfactif de l'insecte, seuls les tests comportementaux permettent de montrer si les insectes sont effectivement attirés ou repoussés par le composé étudié. Ces tests consistent à libérer les insectes à une distance définie d'une odeur connue et d'étudier son comportement et son déplacement à l'aide d'olfactomètres dynamiques et statiques.

Une fois les tests de choix validés, des tests en champ sont à réaliser. Les COVs identifiés peuvent être libérés artificiellement, des plantes peuvent être sélectionnées suivant leurs émissions en molécules attractives ou répulsives ou également transformées afin d'attirer ou repousser les organismes cibles [190]. Un exemple d'application consiste à utiliser des plantes non-hôtes qui émettent des bouquets de COVs similaires à ceux des plants endommagés et qui repoussent ainsi les principaux insectes nuisibles des plantes hôtes attaquées. Cette stratégie de diversion, appelée « push-pull », est utilisée en Afrique subsaharienne pour repousser les lépidoptères dont les chenilles sont connues pour attaquer les cultures de maïs [191].



Figure I-30. Exemples de dispositifs permettant de réaliser des tests comportementaux à l'aide d'olfactomètre dynamique possédant 4 champs d'odeur ★ (A), d'olfactomètre statique (B), ou d'olfactomètre de type tunnel (C) (modifiés d'après respectivement [192], [193] et [194]).

Néanmoins, peu d'applications de lutte biologique ont été réalisées à partir de COVs [190]. D'après Stenberg *et al.* (2015), plusieurs points participent à la complexité de mise en place d'une telle lutte biologique :

- Les COVs jouent plusieurs rôles dans la résistance des plantes, il faut tenir compte de tous les mécanismes dans lesquels ils peuvent être impliqués.
- Les émissions des plantes dépendent de l'environnement et de facteurs abiotiques comme le stress dû à la sécheresse par exemple.
- Les HIPVs sont émis en présence d'herbivores, or si les prédateurs ou parasitoïdes n'ont pas de quoi se nourrir, leur survie diminuera et il y a risque d'ignorance de leur part.
- La présence de nourriture au niveau des plantes attire également les pathogènes.

Objectifs de la thèse

Par ces travaux de thèse, nous avons cherché à développer une nouvelle stratégie d'extraction et de caractérisation des COVs de la lavande et du lavandin afin d'identifier si certains d'entre eux seraient couplés au dépérissement de la lavande. Les travaux précédents réalisés dans le cadre du projet ECHoStol ont utilisés la SPME, technique passive d'extraction, pour piéger les COVs sur le terrain. Cette méthode n'est pas forcément la plus adaptée pour travailler à l'échelle de la plante ou de quelques inflorescences dans un environnement complexe. Il est préférable d'utiliser une méthode dynamique pour contrôler le flux d'air et quantifier avec plus de précision les COVs émis. De plus, par ce système dynamique, les composés piégés et analysés se rapprochent des émissions réelles. Contrairement aux études antérieures utilisant la désorption liquide pour décrocher les composés piégés à la suite d'une extraction DHS en conditions contrôlées, l'objectif est d'utiliser la thermodésorption, plus sensible que l'utilisation de solvant.

Ainsi, les objectifs de la thèse étaient de :

- développer une méthode d'extraction et d'analyse des COVs racinaires,
- développer une étude métabolomique complète incluant l'extraction, la caractérisation et le traitement des données obtenues pour étudier sur le terrain les COVs émis et stockés par les parties aériennes de différentes variétés de lavande et lavandin.

Le développement de ces méthodes permettra de répondre aux deux principales questions cidessous, liées au dépérissement de la lavande :

- (1) Est-ce que la sensibilité/tolérance peut être définie par des différences de compositions chimiques au niveau aérien et racinaire ?
- (2) Existe-t-il une signature chimique caractéristique des plants asymptomatiques ou symptomatiques au dépérissement ?

Ainsi, les COVs émis par les parties racinaires de lavande et lavandin (**Chapitre II**), ceux émis par les parties aériennes en champ (**Chapitre III**) ainsi que les COVs stockés dans les parties aériennes (**Chapitre IV**) ont été étudiés. De plus, un appareil de GC-MS portable a été évalué pour son application sur le terrain (**Chapitre V**). Une dernière partie de conclusion/perspectives fait notamment le lien entre les différentes parties dans le but de mettre en évidence des composés communs entre les études.

Chapitre II.

Étude des composés organiques volatils (COVs) émis par les racines de lavande et lavandin

Chapitre basé sur la publication :

STIERLIN É., NICOLÈ F., FERNANDEZ X., MICHEL T. Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry method to study volatile organic compounds (VOCs) emitted by lavender roots. *Chemistry & Biodiversity*, 2019; 16(8).

II.1. Intérêts d'étudier les COVs émis par les racines

II.1.1. Problématique

L'objet de chapitre est de caractériser les composés organiques volatils (COVs) émis par les racines de lavande et lavandin. D'après le cycle de vie de l'insecte vecteur du phytoplasme, à la fin de l'été, les femelles pondent les œufs au pied des plants de lavande ou lavandin, puis les larves se développent dans le sol en se nourrissant des racines (Figure I-6). Pendant cette période, les larves semblent pouvoir acquérir la bactérie pathogène, le phytoplasme du Stolbur, si celle-ci est déjà présente dans la plante [195]. De plus, les larves apparaissent préférentiellement au niveau des racines de certaines variétés de lavande et lavandin [196]. Étudier les émissions de COVs des parties racinaires pourrait donner une indication sur les molécules pouvant attirer ou repousser les larves au niveau des racines.

En effet, les COVs émis par les parties racinaires peuvent influencer le comportement de nombreux agents pathogènes présents dans le sol tels que les nématodes, larves, champignons ou bactéries et sont connus pour leurs rôles d'attraction, de répulsion ou de défense contre les prédateurs et agents pathogènes [197, 198]. La mycorhization, symbiose entre champignon et plante, a une incidence sur les interactions entre plante et autres organismes par la synthèse notamment d'acide jasmonique qui favorise la croissance des plantes et améliore la tolérance aux stress biotiques et abiotiques [199]. De plus, la libération d'aldéhydes ou de terpènes par les racines de maïs en réponse à l'alimentation des larves de chrysomèle (*Diabrotica virgifera virgifera*) influence sur l'attraction de ces dernières [200]. Les larves de *D. virgifera* utilisent le (*E*)- β -caryophyllène comme signal pour localiser les plantes déjà infectées. Ce composé attire également des nématodes entomopathogènes (*Heterorhabditis megidis*) qui tuent les larves nuisibles [57].

On peut parler de système de défense souterrain produisant une diversité chimique et structurelle de métabolites de défenses comparable à ceux émis par les parties aériennes [44]. De plus, plusieurs métabolites secondaires impliqués dans les défenses des plantes, comme la nicotine ou le gossypol, sont principalement produits dans les racines et sont ensuite transportés dans les parties aériennes des plantes [201]. Les signaux inducteurs de défense peuvent donc se transférer des racines aux parties aériennes.

Cependant, les phénomènes d'attraction ou répulsion utilisant des molécules volatiles comme signaux chimiques pour les organismes se développant dans le sol méritent d'être plus étudiés. A ce jour, peu d'études ont été réalisées en milieu naturel en raison du manque de méthode pratique, les moyens d'extraction de COVs ont préférentiellement été testés sur des racines à l'échelle du laboratoire. Or, le bouquet de composés volatils émis *in situ* serait différent de celui observé en laboratoire en raison de l'influence de l'environnement [202]. Les expériences en laboratoire peuvent néanmoins donner une idée des composés émis par les racines mais doivent pouvoir être extrapolées aux études sur le terrain pour définir réellement les rôles des COVs dans une problématique écologique.

II.1.2. Piégeage des COVs racinaires, un défi

Le piégeage des COVs émis par les racines sur le terrain présente donc un défi méthodologique et implique d'utiliser des outils sensibles et des méthodes analytiques efficaces pour détecter les molécules à l'état de traces dans un environnement complexe [203]. Les COVs émis par les racines sont principalement analysés par GC-MS ou PTR-MS. Or pour analyser les composés en GC, il faut pouvoir les piéger dans le sol. En effet, l'étude de ces COVs présents sous terre nécessite de développer des outils adaptés.

D'après Peñuelas *et al.* (2014), les principales contraintes d'étude des COVs dans le sol sont [198] :

- les faibles connaissances des facteurs contrôlant leur diffusion et leur émission,
- l'hétérogénéité et la complexité des sols contenant diverses bactéries et champignons (plus de 95 % des racines terrestres présentent une symbiose avec des champignons),
- l'accessibilité aux racines dans le sol sans les endommager lors de l'installation du dispositif de piégeage des COVs,
- l'odeur du sol qui peut influencer les piégeages de COVs racinaires.

En raison de cette complexité, il est difficile d'évaluer les flux de COVs émis par les racines dans leurs conditions naturelles.

L'extraction en espace de tête, statique ou dynamique, est souvent employée pour étudier les COVs racinaires que ce soit sur le terrain ou en laboratoire. Rasmann *et al.* (2005) ont par exemple comparé en laboratoire les émissions de racines de maïs saines et infectées par des larves de *Diabrotica virgifera virgifera*, chrysomèle des racines de maïs, à l'aide de la microextraction sur phase solide (SPME) [57]. Ils ont mis en évidence que le *(E)*- β -caryophyllène est émis en plus grande quantité lorsque les racines sont infectées. Toujours à l'échelle du laboratoire, Jassbi *et al.* (2010) ont développé une nouvelle approche pour piéger par extraction en espace de tête dynamique (DHS) et analyser les COVs émis des racines intactes d'*Artemisia tridentata*, l'Armoise tridentée (Astéracée), dans le but d'étudier la phytotoxicité des composés contre *Nicotiana attenuata*, le tabac sauvage (Solanacée) [58].

Le Tableau II-1 synthétise les principales études développées pour étudier les COVs racinaires dans le sol. Plusieurs études font référence à la méthode de PTR-MS présentée dans le chapitre I (Figure I-17). Par exemple, Crespo *et al.* (2012) ont analysé les émissions de COVs émis par les racines de *Brassica nigra* attaquées par les larves de *Delia radicum* par PTR-MS. Cet outil efficace d'analyse en temps réel, leur a permis de mettre en évidence que plusieurs composés soufrés, tels que le méthanethiol, le sulfure de diméthyle, le disulfure de diméthyle, le trisulfure de diméthyle ou encore des produits de dégradation des glucosinolates comme les thiocyanates et les isothiocyanates étaient émis par les racines suite à l'infection. Le plus souvent, l'espace de tête est créé à l'aide d'un dispositif non commercial, développé dans le cadre de l'étude, tel que l'utilisation de sondes introduites dans le sol, de tubes en PTFE ou encore de flacon dans lesquels un piège ou une fibre peuvent y être insérés.

Schéma	Plant	Sur le	Matériel végétal	Procédure d'extraction	Piège	Technique d'analyse	Référence
Pompe Piège Sonde	v	v	Citrus paradisi Macf. x Poncirus trifoliata Rutaceae	Sonde allant dans le sol + pompe	DHS 50 mg Super Q (débit 200 mL/min)	GC-MS (désorption solvant au dichlorométhane)	[204]
SPME Phase stationnaire Tube PTFE perforé	v	v	<i>Brassica oleracea</i> Brassicaceae	Tube en PTFE perforé latéralement	SPME (PDMS/DVB)	GC-MS	[151, 205]
	v		<i>Brassica oleracea</i> Brassicaceae	Tube en PTFE perforé	DHS 200 mg Tenax TA	ATD-GC-MS	[205]
Pièges	V		<i>Brassica nigra</i> Brassicaceae	-	DHS 150 mg Tenax TA + 150 mg Carbopack B (débit 100 mL/min)	ATD-GC-MS	[206]

Tableau II-1. Synthèse et schéma des dispositifs employés en espace de tête pour piéger les COVs émis par les racines dans le sol

	-							
Schéma	Plant	Plant Sur le Matériel végétal		Procédure d'extraction	Piège	Technique d'analyse	Référence	
	en pot	terrain	étudié			. ,		
Vers la pompe pour les COVs des parties aériennes Pièges Vers la pompe pour les COVs des racines	v		<i>Artemisia tridentata</i> Asteraceae	Chambre fermée en plastique	DHS 50 mg Super Q (débit 500 mL/min)	GC-MS (désorption solvant au dichlorométhane)	[58]	
67	٧		Artemisia tridentata Asteraceae	Flacon de 50 mL avec bouchon troué et protégé avec parafilm	HSME 2 μL hexadécane	GC-MS	[58]	
SPME Phase stationnaire Flacon	v		<i>Artemisia tridentata</i> Asteraceae	Flacon de 50 mL avec bouchon troué et protégé avec parafilm	SPME DVB/CAR/PDMS	GC-MS	[58]	
60	٧		<i>Brassica nigra</i> Brassicaceae	Cuvette reliée à l'appareil de PTR- MS	-	PTR-MS	[206, 207]	
Air entrant PTR-MS Cuvette	V		<i>Brassica rapa</i> Brassicaceae	Cuvette reliée à l'appareil de PTR- MS	-	PTR-MS	[208]	

Tableau II-1. (suite)

Tableau II-1. (suite)									
Schéma	Plant en pot	Sur le terrain	Matériel végétal étudié	Procédure d'extraction	Piège	Technique d'analyse	Référence		
(a) (b) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c) (c	V		<i>Taraxacum ruderalia</i> Asteraceae	Système en trois parties dont la partie centrale contenant des disques PTFE (b) sépare le compartiment contenant les racines (c) du compartiment contenant les nutriments (a)	Tubes de PDMS creux	TDU-PTV-GC-MS	[209]		
(a)	V		<i>Malus x domestica</i> Rosaceae	Boîte en PVC composée de deux compartiments dont l'un contient le sol avec racines, insectes et larves (a) et l'autre permet la collecte des COVs (b) sur du charbon actif par le passage d'un flux d'air constant généré par une pompe (séparation des deux compartiments par une fenêtre en nylon (c))	1,5 mg de charbon actif (débit 1 L/min)	GC-MS	[210]		
Tube en Téflon Super Q Vers la pompe Sonde Filtre à charbon	v		<i>Capsicum annum</i> Solanaceae	Sonde allant dans la terre et filtre à charbon actif entre partie extérieure et partie souterraine	30 mg Super Q (débit 170 mL/min)	GC-MS	[211]		

Abraham *et al.* (2015) ont conçu une boîte en PVC composée de deux compartiments dont l'un contenait les racines dans le sol et l'autre permettait la collecte des COVs sur du charbon actif par le passage d'un flux d'air constant généré par une pompe. Ils ont montré que lors de l'attaque par des larves de *Melolontha melolontha*, une induction de la libération de certaines molécules telles que le camphre a été mis en évidence uniquement sur les racines de pommiers infectées.

Cependant, seules deux études présentent des applications sur des plantes cultivées en champ. Deasy *et al.* (2016) ont inséré les fibres SPME dans des tubes de PTFE perforés et placés dans le sol à côté des racines de brocoli [151]. Ce dispositif a permis l'échantillonnage de COVs des racines ainsi que la distinction entre des plantes endommagées par les larves de *Delia radicum* et des plantes non infectées en laboratoire et en extérieur. De même, Ali *et al.* (2012) ont utilisé des sondes insérées dans le sol avec en sortie, des pièges Super-Q associés à une pompe [204]. Les composés volatils présents dans le sol à proximité de plants d'agrumes ont ainsi pu être caractérisés par piégeage de 30 minutes.

À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée en espace de tête sur les racines de lavande ou lavandin. Ce chapitre a pour but de répondre aux questions suivantes :

- (i) Comment étudier et caractériser les COVs émis par les racines de différentes variétés de lavande et lavandin en laboratoire ? (II.2)
- (ii) Peut-on départager des émissions racinaires de plusieurs variétés sensibles ou tolérantes ? (II.3)
- (iii) La méthode développée peut-elle être utilisée pour comparer des plants asymptomatiques et symptomatiques en laboratoire et extrapolée en champ ? (II.4)

II.2. <u>Développement d'une méthode de HS-SPME GC-MS pour étudier les COVs</u> <u>émis par les racines de lavande et lavandin en laboratoire</u>

Ce travail a donné lieu à un article publié dans *Chemistry & Biodiversity* (Vol. 16, 2019, e1900280) inséré ci-dessous. Le but de cette étude était de caractériser les composés émis par les racines en développant une méthode utilisant la microextraction sur phase solide en mode espace de tête (HS-SPME) en laboratoire sur des racines de lavandin *grosso* (*Lavandula x intermedia*), combinée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les principaux résultats obtenus sont résumés à la suite de l'article, en fin de partie.

Published in Chemistry & Biodiversity (Vol. 16, 2019, e1900280)

Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry method to study volatile organic compounds (VOCs) emitted by lavender roots

Émilie Stierlin^a, Florence Nicolè^b, Xavier Fernandez^a, Thomas Michel^a* ^aUniversité Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice UMR 7272, 06108 Nice, France ^bUniversité de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire BVPAM, FRE CNRS INEE 3727 – EA 3061, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42000 Saint-Étienne, France

*Corresponding author. Tel.: +33 4 92 07 61 69; fax: +33 4 92 07 61 89 12 E-mail address: Thomas.MICHEL@univ-cotedazur.fr

Co-authors e-mail addresses:

Emilie Stierlin: Emilie.STIERLIN@univ-cotedazur.fr Florence Nicolè: Florence.NICOLE@univ-st-etienne.fr Xavier Fernandez: Xavier.FERNANDEZ@univ-cotedazur.fr

Abstract

A headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed and optimized for the extraction and the analysis of volatile organic compounds (VOCs) from lavandin and fine lavender roots. Optimal parameters to extract volatile molecules from ground and intact roots were determined using a divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) coating fiber at 70°C for 60 min. A total of 99 VOCs, including 40 monoterpenoids, 15 sesquiterpenoids, 1 diterpenoid and 2 coumarins were detected. The main compounds detected in lavandin roots were fenchol, borneol, and coumarin. Performances of the optimized SPME GC-MS method were evaluated via the comparison of VOC emissions between roots from different cultivars of fine lavender (*7713* and *maillette*) and lavandin (*abrial* and *grosso*). Chemometric analysis, using partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), suggests fifteen significant features as potential discriminatory compounds. Among them, β -phellandrene allows discrimination between lavender and lavandin varieties.

Keywords

Lavender roots; HS-SPME; VOCs; GC-MS.



Graphical illustration

Introduction

Fine lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) are perfume, aromatic and medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. Lavandin is the sterile hybrid of fine lavender and spike lavender (*Lavandula latifolia* Medik). Both plant species are emblematic of Provence (south-east France) where they are widely cultivated for their essential oils (EOs), extracted by hydrodistillation from the inflorescences at full blooming. Lavender EO is mainly composed of volatile organic compounds (VOCs) including monoterpene and sesquiterpene derivatives [4, 116, 212].

Beside their attractive fragrance, volatile compounds are chemical cues involved in plantenvironment interactions [205]. For instance, VOCs emitted by the roots of plants are known to play roles in attraction, repulsion or defense against predators and pathogens [197]. Their influence in the soil is important due to the presence of many pathogens (e.g. nematodes, larvae, fungi, bacteria) [44]. To our knowledge, there is no study on the VOCs emitted by lavender roots. Only Rebey *et al.* (2017) investigated the chemical composition of *Lavandula dendata* EO obtained from roots [213]. They identified 20 molecules with β -ocimene as the major compound.

Collecting root VOCs, in natural condition or in field studies, is an important challenge and requires the use of sensitive tools and efficient analytical methodologies to extract and detect trace molecules in a complex chemical environment [214]. To study plant and root volatiles, both static and dynamic sampling methods have been successfully applied [57, 203–205, 209, 215]. The use of a continuous purified air stream flow to trap belowground VOCs allows to measure them *in situ*. However, due to the cost and the difficulty to set up a dynamic headspace extraction belowground, passive techniques are often preferred and more often used to study VOCs emitted by roots [57, 203, 204, 209, 215, 216]. One of the most implemented passive techniques is solid-phase microextraction (SPME) [217]. It is based on

the adsorption of compounds onto a sorbent (PDMS: polydimethylsiloxane, PA: polyacrylate, CW: carbowax, DVB: divinylbenzene, CAR: carboxen) deposited on a fused silica fiber placed in a hollow needle. The SPME method has several advantages to collect root VOCs, namely sensitivity, low cost, fast and simple implementation, portability and the diversity of available fiber coatings [57, 144, 203, 205, 218, 219]. For all these reasons, we choose the SPME method to investigate lavender root VOCs.

The aims of this work were (i) to optimize the SPME method to trap root-emitted VOCs in lavanders, (ii) to characterize chemical diversity from lavandin root and (iii) to evaluate a metabolomic approach to distinguish lavender and lavandin varieties based on their root-emitted VOCs. The developed method involved HS-SPME sampling, followed by GC-MS and statistical analysis. Four varieties of fine lavender (*7713* and *maillette*) and lavandin (*grosso* and *abrial*) were investigated to control the ability of our method to separate cultivars.

Results and Discussion

SPME method development

The determination of optimal SPME conditions adapted to root lavender extraction was first established. SPME efficiency towards volatile compounds depends on various parameters such as the extraction temperature, the extraction time, and the fiber coating. Optimization of the extraction temperature and the extraction time was made on ground lavandin root using the CAR/PDMS fiber due to its well-known capacity to extract a wide range of VOCs with different physico-chemical properties [220–222].

Extraction temperature

The optimization of the extraction temperature was performed with an extraction time set at 30 min and using CAR/PDMS fiber. The CAR/PDMS fiber was exposed to six different temperatures: 30, 50, 70, 80, 90 and 100°C. The extraction temperature influences the partition coefficient defined as the ratio of concentrations of the compound either between the headspace gas phase and the sample, or between the SPME fiber coating and the headspace gas phase. Indeed, raising the sample extraction temperature can decrease the analyte partition coefficient between the SPME fiber coating and the headspace gas phase. Indeed, raising the sample extraction temperature can decrease the analyte partition coefficient between the SPME fiber coating and the headspace gas phase [112, 223]. As a result, compound recovery at equilibrium decreased, leading to lower method sensitivity. It can be observed that the modification of the temperature can have different effects on the analyte extraction. This effect is illustrated in Figure II-1. Herein, abundance of fenchol and cuparene decreases when temperature reaches 80°C. In contrast, adsorption of thymol and coumarin increases with temperature. Even though the equilibrium was not reached for all the compounds, the optimum temperature of 70°C was therefore chosen as the best compromise since it is the lowest temperature allowing the detection of different chemical family.

Note that the repeatability rate on the number of common peaks/the total mean number of peaks at 70°C was about 80%.



Figure II-1. Log-abundance of coumarin, thymol, cuparene and fenchol compounds detected by HS-SPME GC-MS (30 min, CAR/PDMS fiber), as a function of the temperature of extraction of the ground roots of *L. x intermedia*. Standard deviations are represented and calculated from a triplicate analysis.

Extraction time

Optimization of the extraction time is an important factor to ensure the efficiency of the method. For the determination of the extraction time, the extraction temperature was set at 70°C and the CAR/PDMS fiber was evaluated with six extraction times: 5, 15, 45, 60, 90 and 180 min (Figure II-2). The extraction time of 60 min was chosen because it allowed working in a near equilibrium situation for all analytes. At this extraction time, the repeatability rate between replicates was 85% and the standard deviation was low. Thus, following steps were performed at 70°C for 60 min.



Figure II-2. Log-abundance of coumarin, thymol, cuparene and fenchol compounds detected by HS-SPME GC-MS (70°C, CAR/PDMS fiber), as a function of time for the extraction of the ground roots of *L. x intermedia*. Standard deviations are represented and calculated from a triplicate analysis.

Fiber coating choice

Five different fiber coatings (i.e. CAR/PDMS, PDMS, PA, DVB/CAR/PDMS and PDMS/DVB) were tested at 70°C for 60 min in order to determine their effect on the extraction of volatile compounds. These fibers are coated with single or mixed polymer material differing in polarity and thickness of the film and consequently in their ability to trap compounds. As shown on Figure 3, chromatographic profiles differ according to SPME coatings. The sensitivity of the fibers can be increased by combining several coatings such as PDMS/DVB fiber and DVB/CAR/PDMS fiber (Figure II-3 (d, e)).



Figure II-3. Effect of CAR/PDMS (a), PDMS (b), PA (c), DVB/CAR/PDMS (d), and PDMS/DVB (e) SPME coating on chromatographic profiles of compounds detected by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C) on the ground roots of *L. x intermedia*.

The selection of the coating fiber was based on higher number of detected compounds, with higher peak area (quantity of all compounds detected by one fiber) and the repeatability rate. The results are shown in Figure II-4a. Overall, the DVB/CAR/PDMS and the PDMS/DVB fibers were the most effective for extraction of VOCs from ground lavender roots. Similar numbers of compounds were detected (54 and 53, respectively), while total mean peak area is slightly higher for DVB/CAR/PDMS fiber (29x10⁸ ± 4.4x10⁸) compared to PDMS/DVB fiber (26x10⁸ ± 7.5x10⁸). The same trend can be observed for fenchol, coumarin and thymol (Figure II-4b). For cuparene, both fibers exhibit a similar mean peak area. Clearly, the PDMS/DVB fibers showed higher variability between replicates, whatever the compounds. The ratios between standard deviations and the compounds mean peak areas, expressed as coefficient of variation (CV), confirm this trend. The variability with PDMS/DVB fiber (CV: 29.7) was on average 2.5 times higher than with DVB/CAR/PDMS fiber (CV: 11.2) and this was statistically validated (Levene's test, P-value < 0.05). Additionally, DVB/CAR/PDMS fiber retains a wider range of analytes (from 40 to 275 Da) due to the trapping of higher mass analytes in the outer layer of DVB and lower mass analytes retained in the CAR inner layer [224]. This fiber was therefore chosen for the extraction of VOCs from lavender roots. It is worthwhile to note that PDMS fiber, due to its non-polar nature, failed to capture thymol, whereas the polar PA fiber failed to trap cuparene which is a non-polar compound (Figure II-4b) [225, 226].



Figure II-4. Effect of SPME coating on (a) the mean peak area (bars) and the mean number of compounds (\pm SD) above the bars. (b) The effects on the extraction of fenchol, coumarin, thymol and cuparene detected by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C) on the ground roots of *L. x intermedia*. Standard deviations are represented and calculated from a triplicate analysis.

LRI		LRI		LRI					
	(calc.)	LRI (lit.)	(calc.)	LRI (lit.)	Compound				Identification
	HP-5MS		HP-INNOV	Vax	. MW		Ground roots	Intact roots	methods
1	-	-	1625	1623	γ-butyrolactone	86	0.4	0.1*	LRI, MS
2	-	-	1070	1075	camphene	136	0.1*	-	LRI, MS
3	-	-	1315	1313	3-octanone	128	tr.*	0.2*	LRI, MS
4	-	-	1500	1490	2-ethylhexanol	130	0.2*	0.1*	LRI, MS
5	-	-	1190	1183	α-terpinene	136	tr.*	-	LRI, MS
6	-	-	1209	1217	limonene	136	0.1*	1.8*	LRI, MS
7	-	-	1284	1283	<i>p</i> -cymene	134	0.1*	-	LRI, MS
8	-	-	1220	1227	β-phellandrene	136	0.1*	0.1*	LRI, MS
9	1050	1054	-	-	butylbenzene ^[b]	134	-	0.5	LRI, MS
14	1065	1063	1478	1470	trans-sabinene hydrate	154	0.7 ± 0.2	2.9 ± 0.3	LRI, MS
15	1069	1081	-	-	terpinolene	136	0.1	0.1	LRI, MS
16	1071	1099	-	-	1,3,8-p-menthatriene ^{[a], [b], [t]}	134	0.9 ± 0.3	3.4 ± 0.4	LRI, MS
17	1073	1079	-	-	linalool oxide	170	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.2	LRI, MS
18	1073	1078	-	-	<i>cis</i> -thujanol	154	-	0.2	LRI, MS
19	1078	1074	-	-	phenylacetaldehyde ^[b]	120	-	0.1	LRI, MS
20	1083	1067	1257	1253	ɣ-terpinene	136	0.1	0.2	LRI, MS
21	1087	1075	-	-	acetophenone ^{[a], [b]}	120	0.1	0.2	LRI, MS, std
22	1090	1073	1569	1560	1-octanol ^[b]	130	-	0.1	LRI, MS
23	1093	1096	1423	1416	fenchone	152	0.1*	0.1	LRI, MS, std
24	1095	1095	1420	1452	<i>p</i> -cymenene ^{[a], [b]}	132	0.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	LRI, MS
25	1096	1090	1558	1549	linalool	154	-	0.3 ± 0.1	LRI, MS, std
26	1097	1110	-	-	6-hydroxycamphene ^{[a], [b]}	152	-	0.2	LRI, MS
27	1103	1102	1408	1409	nonanal	142	tr.*	2.1 ± 0.1	LRI, MS, std
29	1113	1121	1605	1642	fenchol	154	41 ± 1.7	40.6 ± 1.3	LRI, MS, std
30	1116	1123	1645	1639	<i>trans</i> -p-mentha-2,8-dien-1-ol ^[b]	152	0.4 ± 0.2	0.4	LRI, MS
33	1129	1132	-	-	cis-limonene oxide	152	-	0.3	LRI, MS
34	1137	1145	1541	1531	camphor	152	0.1	0.2	LRI, MS, std

Table II-2.VOCs identified by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C, DVB/CAR/PDMS fiber) from *grosso L. x intermedia* roots.

35	1139	1145	-	-	verbenol ^[b]	152	0.2 ± 0.1	0.2	LRI, MS
36	1144	1152	-	-	<i>p</i> -vinylanisole ^{[a], [b]}	134	-	0.3 ± 0.1	LRI, MS
37	1149	1146	-	-	(E,E)-2,6-nonadienal ^{[a], [b]}	138	0.1	0.4 ± 0.1	LRI, MS
38	-	-	1513	1502	menthone	154	tr.*	-	LRI, MS
39	1160	1162	1722	1717	borneol	154	4.5 ± 0.3	13.2 ± 0.4	LRI, MS, std
40	1166	1169	1571	1576	<i>cis</i> -pinocamphone ^[b]	152	0.1*	1.8 ± 0.1	LRI, lit.
41	1167	1162	-	-	dihydro-y-terpineol ^{[a], [b]}	156	0.4	-	LRI, MS
42	1169	1172	1622	1624	terpinene-4-ol	154	0.5	1.5 ± 0.1	LRI, MS
43	1179	1180	-	-	<i>p</i> -cymene-8-ol	150	0.1	0.4	LRI, MS
44	1185	1187	1809	1800	methyl salicylate ^{[a], [b]}	152	1.8 ± 0.4	2.0	LRI, MS, std
45	1187	1192	1656	1648	myrtenal	150	0.4*	0.4	LRI, MS
46	1193	1191	1690	1692	α-terpineol	154	$0.2 \pm 0.1^*$	0.9 ± 0.1	LRI, MS, std
48	1198	1195	1735	1731	(1S)(-)verbenone	150	0.1	0.1*	LRI, MS
49	1200	1221	-	-	citronellol ^{[a], [b]}	156	-	4.1 ± 0.3	LRI, MS
50	1205	1216	1683	1680	(E,E)-2,4-nonadienal ^{[a], [b]}	138	0.2	-	LRI, MS
51	1208	1208	-	-	trans-piperitol ^[b]	154	-	0.3 ± 0.1	LRI, MS
52	1209	1217	-	-	trans-carveol ^[b]	152	0.4 ± 0.1	-	LRI, MS, std
53	1210	1220	1896	1882	<i>cis</i> -carveol ^[b]	152	0.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1	LRI, MS, std
54	1213	1218	-	-	2-hydroxycineol ^[b]	170	0.3 ± 0.2	2.0 ± 0.6	LRI, MS
55	1215	1220	1596	1588	bornyl formate	182	0.3 ± 0.1	0.8	LRI, MS
56	1231	1239	1760	1763	carvone	150	0.7 ± 0.1	0.2	LRI, MS, std
57	1250	1250	1863	1857	geraniol	154	0.1*	0.2	LRI, MS, std
58	1257	1272	-	-	<i>p</i> -mentha-1,8-dien-3-one ^{[a], [b]}	150	1.0 ± 0.2	-	LRI, MS
60	1258	1252	-	-	geranial ^{[a], [b]}	152	0.1	-	LRI, MS
62	1278	1290	2149	2162	thymol ^[b]	150	-	0.8 ± 0.4	LRI, MS
63	1280	1302	2255	2239	carvacrol ^[b]	150	0.3 ± 0.1	0.5	LRI, MS
66	1319	1327	-	-	eucarvone ^[b]	150	0.1	-	LRI, MS
67	1338	1346	-	-	α-cubebene	204	0.1	0.1	LRI, MS
69	1352	1351	1508	1500	α-copaene ^[b]	204	0.1*	0.3	LRI, MS
72	1377	1361	-	-	<i>trans</i> -jasmone ^{[a], [b]}	164	tr.	-	LRI, MS
75	1394	1394	-	-	vanillin ^{[a], [b]}	152	0.1	0.3 ± 0.1	LRI, MS, std
76	1432	1432	-	-	coumarin	146	41.3 ± 2.1	4.7 ± 0.6	LRI, MS, std

77	1433	1432	-	-	geranyl acetone	194	-	0.3 ± 0.1	LRI, MS
78	1446	1447	1616	1625	α -himachalene ^[b]	204	0.1	0.1	LRI, MS
79	1456	1455	1621	1617	α-caryophyllene	204	0.1*	0.2	LRI, MS
80	1459	1455	1664	1660	aromadendrene ^[b]	204	0.1*	0.2	LRI, MS
81	1461	1466	1733	1740	valencene ^[b]	204	0.2	-	LRI, MS
82	1471	1469	-	-	β-himachalene ^{[b], [ť]}	204	-	0.1	LRI, MS
83	1473	1475	-	-	β-chamigrene ^{[b], [t']}	204	0.1	0.1	LRI, MS
84	1477	1475	1850	1849	cuparene ^[b]	202	0.2	0.4 ± 0.1	LRI, MS
85	-	-	1743	1743	β-selinene	204	$0.2 \pm 0.1^*$	-	LRI, MS
86	1490	1504	-	-	tridecanal	198	-	0.4	LRI, MS
87	1495	1496	-	-	calamenene ^{[b], [t']}	202	tr.	-	LRI, MS
88	1497	1503	1778	1765	cadinene ^[b]	204	0.1	0.3	LRI, MS
89	1507	1507	-	-	α-farnesene ^[t']	204	0.1	0.2 ± 0.1	LRI, MS
90	1513	1512	-	-	β-calacorene ^{[b], [t']}	200	0.1	0.1	LRI, MS
91	1585	1587	-	-	viridiflorol	222	0.1	-	LRI, MS
92	1594	1580	-	-	lauric acid	200	-	0.1	LRI, MS
93	1765	1732	-	-	7-methoxycoumarin	176	1.3 ± 0.2	-	LRI, MS, std
94	1795	1790	-	-	guaiazulene ^[b]	198	-	0.2	LRI, MS
98	1873	1870	-	-	benzyl salicylate ^{[a], [b]}	228	0.1	-	LRI, MS
99	2048	2055	-	-	abietatriene ^{[a], [b]}	270	-	0.4 ± 0.2	LRI, MS
	•						Nb (%)	Nb (%)	
					Monoterpene hydrocarbons		10 (2.5)	8 (8.5)	-
					Oxygenated monoterpenes		21 (50.1)	24 (68.4)	-
					Sesquiterpene hydrocarbons		12 (1.4)	11 (2.2)	-
					Oxygenated sesquiterpenes		1 (0.1)	-	-
					Coumarins		2 (42.6)	1 (4.7)	-
					Diterpene		0 (0)	1 (0.4)	-
					Total compounds		68	82	-

Area expressed as a percentage of the total GC area.

^[a] first identification in *Lavandula sp.*, ^[b] first identification in *L. x intermedia*.

^[t] tentatively identified but discrepancies between the two LRI.

^[t'] tentatively identified but potential mix up with other compounds.

* compound only identified on HP-INNOWax column.

tr. (trace compounds) refer to compound detected with relative percentages < 0.1%.

LRI (calc.), linear retention index calculated according to the retention times of standard n-alkane C₆-C₂₄ mixture.

LRI (lit.), linear retention index reported in the literature (NIST, ESO) [227–229].

MS, tentatively identified by the spectral libraries. Std, standard identification.

MW, molecular weight.

-, absent.

SD, standard deviation.
Characterization of VOCs from L. x intermedia roots

The SPME extracts from ground or intact root of *L. x intermedia* gave very similar phytochemical profiles. The Table II-2 and Figure II-4 listed the volatile compounds characterized by HS-SPME GC-MS in *L. x intermedia* roots for the two types of material. Results for each type of material are detailed below.

VOCs from L. x intermedia ground roots

A total of 68 compounds were detected after HS-SPME GC-MS analysis. Among them, 62 were identified (98.6% of the total GC area), mainly as oxygenated monoterpenes (50.1 ± 3.3%) such as borneol (**39**) (4.5 ± 0.3%), camphor (**34**) (0.1%), fenchol (**29**) (41.0 ± 1.7%) and thymol (**62**) (0.3 ± 0.1%) (Figure 5). Monoterpene hydrocarbons (2.5 ± 0.6%), sesquiterpene hydrocarbons (1.4 ± 0.1%) and oxygenated sesquiterpenes (0.1%) were identified in lower abundance (Figure 5). Two coumarins were also detected in all ground root samples: coumarin (41.3 ± 2.1%) and 7-methoxycoumarin (1.3 ± 0.2%). Herein, fenchol and coumarin represent about 80% of the total relative area of all detected compounds (Figure II-5). These two compounds were previously described in the essential oils of lavender and lavandin [230, 231]. Additionally, the use of two orthogonal stationary phases (i.e. HP-5MS non-polar column and HP-INNOWax polar column) improves the identification rate, especially for sesquiterpenes which can easily co-elute when separated on a non-polar column. Eighteen minor compounds (1.2 ± 0.1% of the total GC area), including camphene (0.1%) or α -terpinene (*tr.*), were detected when separation was carried out on a polar column. In addition, six volatile compounds from ground roots of lavandin remained unidentified (1.4%) (Annexe 2).

VOCs from L. x intermedia intact roots

The HS-SPME GC-MS analysis of intact roots revealed 80 compounds, among which 49 were described above in the ground roots section. In other words, the extraction on intact roots allows the extracting of 31 new compounds, compared to ground material. 62 compounds were tentatively identified in intact roots representing 94.1% of the total GC area. They mainly belong to the oxygenated monoterpenes family ($68.4 \pm 3.8\%$) (Figure 5). Borneol (**39**) ($13.2 \pm 0.4\%$) and fenchol (**29**) ($40.6 \pm 1.3\%$) are here again the two main compounds detected in ground and intact roots, but in different abundances. As shown in Table II-2, an equivalent number of monoterpene hydrocarbons were identified in both root extracts even if the abundance is higher in intact roots than in ground roots, probably because coumarin derivatives were emitted during the stress caused by grinding [232]. Sesquiterpene hydrocarbons could also be identified in lower abundance (such as cuparene) but no oxygenated sesquiterpenes were detected (Table II-2). In addition, eighteen compounds have not yet been identified in intact roots of lavandin (6%) (Annexe 2).



Figure II-5. Chromatograms of compounds detected by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C, DVB/CAR/PDMS fiber) on the intact roots of *L. x intermedia*. The numbers correspond to the compounds detailed on Table II-2 and Annexe 2.

Putative identification of new compounds emitted by lavenders

To our knowledge, this study is the first report on VOCs emitted by lavender and lavandin roots. Compounds newly characterized in *Lavandula* genus or in *L. x intermedia* were highlighted in Table II-2. Interestingly, a diterpene (i.e. abietatriene (**99**)) was for the first time characterized in VOCs emitted by *Lavandula* species. Chemotaxonomic study indicates that abietatriene has already been identified in the Lamiaceae family, especially in *Hyptis suaveolens* essential oil [233]. Some other compounds were characterized for the first time in lavandin (all parts and extraction modes included). This is the case for butylbenzene (0.5%) and 6-hydroxycamphene (0.2%) both emitted by intact roots and already described in Lamiaceae and Asteraceae families [234–237].

Metabolomic discrimination of four varieties of lavender/lavandin from root-emitted VOCs

The ability of the optimized SPME GC-MS method was tested to find distinctive patterns of belowground VOCs among varieties of lavenders (i.e. *7713, maillette, grosso, abrial*). Metabolomic study were performed on both sample preparations but only results obtained with intact roots are shown below (ground sample results are available in Annexe 3). Intact root VOCs are more representative of *in vivo* emitted compounds. Furthermore, the repeatability rate was higher in intact samples (96%) than in ground samples (64%).

Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was performed on the four varieties to detect differences between the chemical profiles. On Figure II-6, each point represents a sample and the color differentiates the varieties. The confidence ellipses for each group are plotted to highlight the differences between samples (confidence level set to 95% by default). The validity of the PLS-DA model is evaluated by cross validation CV (outer loop: 7-fold CV, inner loop: 6-fold CV), the mean number of misclassifications (NMC) and a permutation significance test based on model cross validation. The PLS-DA score plot (Figure II-6) showed that the two species are separated on the first discriminant axis, lavandin being on the right and fine lavender being on the left. The differences between varieties among species is clear: high cumulative explained inter-variance (55%), small percentage of misclassification (6.25%) and significant difference between the varieties (*P*-value < 0.05). Not only the aerial parts of lavender emitted different chemical profiles. It is also possible to differentiate varieties according to the VOCs emitted by the roots.



Figure II-6. PLS-DA score plot of compounds emitted by intact fine lavender and lavandin root varieties. The inter-variance explained by the two components is 55%.

Our model of PLS-DA identified 54 features that had VIP (Variable importance in projection) score higher than 1. Based on *multtest* function of mixOmics R package which consists in group comparisons for multiple variables using parametric test (ANOVA), fifteen significant features were selected as potential discriminatory compounds (Figure II-7 and Table II-3). Among tHEe fifteen VOCs, monoterpenoids (α -terpineol, 1,8-cineole, β -phellandrene, terpinen-4-ol, borneol, fenchol), sesquiterpenes (α -farnesene, cuparene), alcohol (benzyl alcohol) and aldehydes (nonanal, benzaldehyde) could be distinguished. β -phellandrene allows the discrimination at the species level, between lavender and lavandin. Other compounds separate varieties. For example, 1,8-cineole emission rate was lower in *7713* variety and benzyl alcohol was lower in *abrial*. Interestingly, the most discriminant molecules, α -farnesene and α -terpineol, were both found with higher emission rate in *7713* and *abrial* cultivars.

Furthermore, three compounds remain non-identified (NI-21, NI-22 and NI-6). According to its fragmentation pattern exhibiting phenyl ion at m/z 77 and an odd molecular ion at m/z 151 (meaning at least one nitrogen according to nitrogen rule), NI-22 could correspond to an aromatic oxime (Annexe 2).



Figure II-7. The top 15 most significant metabolites that discriminate four varieties of fine lavender and lavandin roots. Significant metabolites were selected based on Variable Importance in Projection (VIP) score of a PLS-DA model.

Dt (min)	Compound	LRI (calc.)	LRI (lit.)	VIP score	P-value	Group means			
						7713	abrial	grosso	maillette
42.07	α-farnesene	1507	1507	2.1148	< 0.001	7.30	4.46	-8.40	-6.03
21.11	α-terpineol	1190	1191	1.8248	<0.1	7.758	0.35	-8.40	-6.03
11.45	1,8-cineole	1023	1033	1.7108	<0.001	-6.49	3.36	4.36	5.40
35.26	NI-21	1399	-	1.3693	<0.001	5.70	-8.80	-8.40	-6.03
6.91	NI-22	925	-	1.3335	<0.001	-6.49	-8.80	5.87	-6.03
13.02	β-phellandrene	1051	1041	1.3188	<0.001	-6.49	3.78	4.46	-6.03
20.00	terpinene-4-ol	1172	1172	1.1983	<0.01	7.76	5.75	6.97	8.81
11.98	benzyl alcohol	1033	1035	1.1753	<0.001	-6.49	2.86	-8.40	-6.03
15.91	nonanal	1101	1102	1.1752	<0.1	7.11	5.38	6.05	9.39
31.80	α-cubebene	1346	1346	1.1708	<0.01	7.11	5.38	6.05	9.39
17.43	NI-6	1124	-	1.1626	<0.1	-6.49	-0.74	4.46	-6.03
40.32	cuparene	1479	1475	1.1155	<0.1	8.90	5.86	6.22	7.81
19.40	borneol	1163	1162	1.1084	<0.01	8.68	7.18	7.85	9.43
16.32	fenchol	1114	1121	1.0977	<0.01	9.01	7.35	7.98	9.79
8.12	benzaldehyde	953	966	1.0730	<0.1	5.55	3.82	4.77	6.19

|--|

LRI (calc.), linear retention index calculated according to the retention times of standard n-alkane C₆-C₂₄ mixture.

LRI (lit.), linear retention index reported in the literature (NIST, ESO) [227–229].

NI, not identified.

Rt, retention time.

VIP, Variable Importance in Projection. VIP scores were obtained from PLS-DA model.

Conclusions

Despite the numerous previous studies dealing with the essential oil and volatile fraction of lavender, the present work provides new insights in the characterization of VOCs from the roots of fine lavender and lavandin. The analytical approach combining HS-SPME with GC-MS has proved to be a powerful tool for characterization of volatile compounds. Thus, 99 VOCs were detected in lavandin roots including 40 monoterpenoids, 15 sesquiterpenoids, 1 diterpenoid and 2 coumarins. The main identified compounds were fenchol, borneol, and coumarin. Among all the detected compounds, coumarin represents on average 70% of the total emitted compounds on the ground roots and 20% on the intact roots. Abietatriene, a diterpene compound, was for the first time described in VOCs emitted by *Lavandula* species. It is worth noting that several compounds remained unidentified revealing the chemical diversity of lavender roots.

The optimized analytical method was then employed to analyze and discriminate VOCs from different cultivars of fine lavender (7713 and maillette) and lavandin (abrial and grosso). Multivariate analysis between varieties identified 15 discriminatory compounds. Both α -farnesene and α -terpineol differentiate varieties, while β -phellandrene allows the discrimination between lavender and lavandin species. Nonetheless, the scale of these findings is limited by the low number of varieties and sample size. Therefore, a metabolomic approach using bigger dataset should be applied to confirm these results. These findings provide a better understanding of volatile constituents from lavender roots, and a metabolomic strategy that could be used to identify chemical cues involved in plant-insect interactions, such as interaction between *Lavandula sp.* and *Hyalesthes obsoletus*, an insect that attacks lavender fields [32].

Experimental Section

Plant material

Two plants of *grosso*, the most cultivated variety of lavandin (*L. x intermedia*), were used to optimize SPME method. Samples were obtained from one-year plants purchased in January 2017 at the Petruccioli garden center (Nice, France). For the varieties comparison, we used a one-year non-infected plant for each four different varieties provided by the CRIEPPAM (Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales, Manosque) with traceability and origin controlled by GNIS (Groupement national interprofessionnel des semences et plants). The two varieties of fine lavender are *7713* and *maillette*, and the two varieties of lavandin are *abrial* and *grosso*. They were cultivated in substrate containing horse manure, cut grass and green waste. The roots, cut from the aerial plant parts, were washed with water, and separated in two groups. A batch of roots was ground in liquid nitrogen using a mortar, the other was air-dried, and left intact and both were stored at -20°C until further experiments.

Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME)

SPME fibers were obtained from SUPELCO (Bellefonte, PA, USA). Five types of coating on the fiber were tested: carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS; 75 μ m), polydimethylsiloxane (PDMS; 100 μ m), polyacrylate (PA; 85 μ m), divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS; 50/30 μ m) and polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB; 65 μ m).

Before using the fibers for the first time, they were conditioned according to the manufacturer's instructions. Furthermore, between each headspace extractions, fibers were reconditioned for 5 min at 250°C [238].

 0.2 ± 0.01 g of ground or intact roots were placed in a 20 mL glass vial closed with a silicone septum. Studying ground roots allows better storage of the plant material and the possibility to reproduce the experiments on the same matrix.

After one hour of headspace saturation at ambient temperature, each sample was incubated for 10 min at six different temperatures (30, 50, 70, 80, 90 or 100°C) and stirred at 500 rpm to homogenize the heating of the roots. This step was carried out with automatic SPME autosampler (CombiPal system, CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Afterwards, the conditioned fibers were introduced in the vial for extraction realized during 5, 15, 45, 60, 90 or 180 min while keeping the temperature at 30, 50, 70, 80, 90 or 100°C. The fibers were then introduced into the gas chromatographic (GC) injector equipped with a 0.75 i.d. SPME insert (Supelco, Bellefonte, PA, USA) for both polar and non-polar analyses [238, 239].

Gas chromatography – mass spectrometry analysis (GC-MS)

Volatile compounds emitted from lavender roots were analyzed with a gas chromatograph model Agilent 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a mass-selective detector (5973) and connected to a multifunction automatic sampler (Combi-Pal, CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Two columns were used for chemical analyses: an HP-5MS non-polar column ((5%-Phenyl)-methylpolysiloxane, 30 m × 250 μm, 0.25 μm film thickness, Agilent), and an HP-INNOWax polar column (polyethylene glycol (PEG) stationary phase, 50 m × 200 µm, 0.40 µm film thickness, Agilent). In both cases, desorption was realized for 4 min at 250°C (split vent open at 150 mL/min), and injections were carried out in splitless mode. Helium was used as carrier gas (constant flow rate of 1 mL/min). With the HP-5 column the oven temperature was initially held at 50°C for 2 min and then increased from 50°C to 180°C (2°C/min), then from 180°C to 250°C (15°C/min) and finally held at 250°C for 10 min. With the HP-INNOWAX column, the oven was initially programmed at 50°C for 2 min and then increased from 50°C to 180°C (2°C/min), then from 180°C to 220°C (15°C/min) and then held at 220°C for 10 min. The transfer line and the ion source temperatures of the mass spectrometer were set to 250°C. Due to the absence of automatic sampler, extraction and injection on the polar column were performed manually. In both cases, electronic ionization was performed at 70 eV with a mass scan range of 40 to 400 m/z.

Identification of compounds

Identification of compounds were carried out by comparison of the mass spectra with those recorded by internal or commercial mass-spectral libraries (NISTO2 and Wiley6n) and by comparison of their linear retention indices (LRI) with those of literature (NIST, ESO) [227–229]. Retention indices (RI) were calculated using a formula according to Van den Dool and Kratz and according to the retention times of standard *n*-alkanes C_6 - C_{24} mixture (SUPELCO). Two drops of alkane's mixture diluted to 0.1% in dichloromethane were analyzed by HS-SPME GC-MS according to the method described previously.

Using the optimized and validated method, some commercial standards were analyzed with the same method in split mode (1:100) to confirm the identities of VOCs detected.

Statistical analyses

To obtain the final matrix with samples in row and retention times in columns, raw data were aligned using metaMS.runGC function of Workflow 4 Metabolomics (W4M) (retention time tolerance of 0.05 min; minimum features of 5; and a threshold value of 0.7) [183, 240]. All other statistical analyses were done using R v3.5.1 software (R Foundation, Institute for Statistics and Mathematics, Austria). Three technical replicates were performed for each plant and the repeatability was estimated by the standard deviation (SD) and variation coefficient (CV) among replicates. The repeatability rate was calculated from the number of common peaks and the total mean number of peaks detected. Optimal conditions were determined by monitoring the abundances of four compounds: fenchol (oxygenated monoterpene), thymol (phenol), coumarin and cuparene (sesquiterpenes). These compounds were selected based on their chemical diversity and because they are representative constituents of VOCs emitted from plants [4]. To separate the chemical profiles between species and cultivars, a Partial Least Square - Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed with the PLS-DA function of mixOmics R package (6-fold inner loop cross validation, 7-fold outer loop cross validation, and a 10-time permutation test) [179], after normalization by the *clr* function (Hotelling package). The compounds with a VIP (Variable Importance in Projection) score higher than 1 were considered. Package ade4 and RVAideMemoire were respectively used to carry out graphical representation and to select discriminant compounds. multtest.gp function of RVAideMemoire package was used to give group means and standard errors for each compound.

Acknowledgements

The authors thank the CRIEPPAM for providing certified healthy variety plants. We also thank all the partners involved in the EUCLIDE project (n° 154827) co-funded by the SPLP Funds (http://www.sauvegarde-lavandes-provence.org/fr/) and the PACA region.

Author Contribution Statement

E. S. performed the experiments and analyzed the data. E. S., F. N., X. F. and T. M. wrote the paper. F. N., X. F. and T. M. supervised the research work. All authors read and approved the article.

Cet article décrit la méthode d'extraction HS-SPME GC-MS développée et optimisée pour extraire et analyser les COVs de racines de lavande fine et de lavandin. Les paramètres optimaux pour caractériser ces COVs sont les suivants : fibre SPME composée de divinylbenzène-carboxène-polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS), 60 minutes d'extraction à 70°C. Un total de 99 COVs, dont 40 monoterpénoïdes, 15 sesquiterpénoïdes, 1 diterpénoïde et 2 coumarines ont été détectés dans les racines de lavandin *grosso*. Le fenchol, le bornéol et la coumarine ont été identifiés comme les principaux composés. Ces trois composés ont d'ailleurs été identifiés dans une HE obtenue à partir de racines de lavandin *grosso* [241].

La méthode optimisée dans notre étude a donc été utilisée pour comparer les COVs émis des racines de différentes variétés de lavande fine (7713 et maillette) et de lavandin (*abrial* et *grosso*).

Une répartition significative en COVs émis en fonction des différentes variétés de racines a été observée. 15 composés discriminants potentiels ont pu être mis en évidence après analyses discriminantes réalisées sur le jeu de données. Parmi ceux-ci, l' α -farnésène et l' α -terpinéol semblent être des marqueurs de la lavande fine 7713 ainsi que du lavandin *abrial*, variétés considérées comme plus sensibles au dépérissement, comparées à la lavande fine *maillette* et au lavandin *grosso*.

II.3. Différence de signatures chimiques entre variétés sensibles et tolérantes

D'après la partie 1.2.3, des expériences sur le terrain ont indiqué que certaines variétés présentaient un nombre inférieur de larves et de nymphes au niveau de leurs racines (données internes, CRIEPPAM 2013) : c'est le cas de la variété de lavande fine *maillette* et du lavandin *grosso*. A l'opposé, des populations plus importantes de larves ont été rapportées sur des variétés plus sensibles telles que sur *7713* (lavande fine) et *abrial* (lavandin) [196, 242]. Dans notre étude développée en partie II.2, les molécules les plus discriminantes, α -farnésène et α -terpinéol, ont toutes deux été trouvées avec un taux d'émission plus élevé chez les variétés sensibles (c'est-à-dire *7713* et *abrial*). Les différents diastéréoisomères d' α -farnésène tels que le (*Z*,*E*)- α -farnesene et le (*E*,*E*)- α -farnesene sont connus pour stimuler les antennes de *H. obsoletus* mâle et femelle [32]. Ce composé peut donc potentiellement jouer un rôle dans l'attractivité de la cicadelle femelle à pondre sur les variétés sensibles ou favoriser le développement des larves dans le sol.

Afin de déterminer si une signature chimique commune existe entre les variétés sensibles et les variétés tolérantes, des analyses discriminantes ont donc été réalisées des racines intactes de six variétés sélectionnées par le CRIEPPAM : deux variétés considérées comme sensibles au dépérissement (lavande 7713 et lavandin *abrial*) et quatre tolérantes (lavandes *diva* et *maillette* ainsi que lavandins *grosso* et *supian*). Le but est ici de comparer les émissions de COVs des parties racinaires sur plus de variétés et d'ainsi mieux caractériser ce statut de sensibilité et de tolérance au dépérissement sur plus d'échantillons. Pour cela, trois

prélèvements de racines intactes ont été réalisés à partir de trois plants de chaque variété (54 échantillons au total), puis extraits en espace de tête et analysés par GC-MS. La matrice de données obtenue, comprenait les aires des 76 composés détectés dans les différentes variétés et a été soumise à normalisation et traitement statistique selon la même approche développée en partie II.2.



Figure II-8. Analyse discriminante (PLS-DA) sur les composés émis par les racines intactes de variétés tolérantes (MAIL : *maillette* ; DIVA ; GROSSO ; SUP : *supian*) ou sensibles (ABR : *abrial* ; 7713) de lavande fine et de lavandin.

L'analyse PLS-DA a permis de départager les échantillons étudiés en deux groupes suivant le statut sensible/tolérant des plants (Figure II-8). Les émissions de COVs des racines semblent donc significativement différentes entre les plants dits sensibles *vs.* les tolérants (*P*-valeur < 0,05). 25 marqueurs ayant un score VIP supérieur à 1 ont ainsi été mis en évidence dont 2 coumarines, 9 monoterpènes, et 1 sesquiterpène (Tableau II-4). Les coumarines sont ressorties comme molécules les plus discriminantes (score VIP > 1,5) et sur-exprimées par les racines tolérantes. Or ces molécules sont connues pour être induites suite à des coupures (stress abiotiques ou oxydatifs) [232, 243]. Cependant, lorsqu'on regarde l'influence du statut sur chaque composé, les coumarines ne font pas parties des dix composés révélant des différences d'aires relatives significatives entre les racines sensibles et tolérantes (Figure II-9). Des essais d'analyses discriminantes ont été réalisées en ôtant les coumarines des matrices pour voir si d'autres composés plus minoritaires seraient à l'origine de cette différence entre sensible/tolérant. Or, les mêmes composés présentés dans le Tableau II-4 sont ressortis comme discriminantes. De même, en se concentrant sur chaque espèce, c'est-à-dire en réalisant des analyses discriminantes uniquement sur les trois variétés de chaque espèce,

aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre des plants tolérants et des plants sensibles.

Les dix composés (épi-cadinol, pipériténone, benzaldéhyde, alcool benzylique, p-cyménène, thymol, phénol, *trans*-sabinène hydrate, *trans*-p-mentha-2,8-dien-1-ol et oxyde de *cis*-carvone) émis plus abondement par des plants sensibles pourraient ainsi être des marqueurs de sensibilité.

Tableau II-4. Les 25 métabolites les plus significatifs permettant de départager des racines issues de
variétés tolérantes ou sensibles de lavande fine et de lavandin.

NI ^o	Composé	Score V/IP	IR(calc)	IR (lit)	p-valeur
IN	Compose	SCOLE VIE	in (calc.)	IN (III.)	corrigée
1	coumarine	2,101	1424	1432	0,4887
2	7-méthoxycoumarine	1,627	1708	1732	0,6638
3	eugénol	1,393	1347	1353	0,4972
4	trans-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	1,378	1168	1165	0,4972
5	1-octanol	1,344	1089	1073	0,5112
6	épi-cadinol	1,341	1604	1615	0,0643
7	géranyl acétone	1,272	1441	1432	0,3139
8	pipériténone	1,248	1325	1315	0,0412
9	benzaldéhyde	1,230	952	958	0,4972
10	<i>(E)</i> -4-decen-10-yne	1,191	1269	1244	0,7619
11	alcool benzylique	1,178	1029	1033	0,0643
12	dodécanol	1,173	1463	1469	0,5411
13	(E)-tridecen-1-ol	1,163	1590	1570	0,3139
14	(E,E)-2,6-nonadiénal	1,142	1148	1146	0,3139
15	p-cyménène	1,135	1084	1095	0,3139
16	thymol	1,108	1283	1290	0,4972
17	phénol	1,105	988	989	0,0528
18	trans-sabinène hydrate	1,098	1062	1064	0,5443
19	nonanal	1,089	1101	1102	0,6476
20	bornéol	1,086	1156	1162	0,6638
21	trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol	1,082	1116	1123	0,2485
22	carvacrol	1,060	1290	1302	0,4972
23	oxyde de <i>cis</i> -carvone	1,029	1265	1263	0,3278
24	trans-carvéol	1,019	1188	1217	0,8364
25	aromadendrène	1,005	1464	1455	0,9954

IR (calc.), indice de rétention calculé en fonction des temps de rétention d'un mélange d'alcanes $C_6\text{-}C_{24}.$

IR (lit.), indice de rétention référencé dans la littérature (NIST, ESO).

VIP, Variable Importance in Projection. Les scores VIP ont été obtenus suivant le modèle PLS-DA.



Figure II-9. Changements dans l'abondance relative des 25 composés discriminants présentés dans le Tableau II-4 en fonction du statut sensible (rouge) et tolérant (vert) (Mann & Whitney, test non-paramétrique - *p < 0,05).

Cette étude a toutefois fourni des résultats nouveaux en termes de caractérisation des composés volatils émis par les racines de lavande et lavandin et présente une approche métabolomique prometteuse dans la distinction des COVs de racines sensibles et tolérantes. Parmi les composés émis, le benzaldéhyde (9), l'alcool benzylique (11), le nonanal (19) et le bornéol (20) ont également été identifiés lors de l'étude départageant quatre variétés de racines (II.2). Ces 4 composés tendent à être émis en plus grande quantité par des racines sensibles, même si aucun de ces composés ne présentent de différences d'aires significatives entre plants sensibles et tolérants (Figure II-9). Seule la pipériténone (8) est significativement plus émise par les racines sensibles comparées aux racines tolérantes. Cependant, la présence d' α -farnésène et d' α -terpinéol potentiellement plus émis par les racines sensibles dans la partie II.2 n'a pas été confirmée lorsque l'étude a été élargie sur six variétés. Ces études n'ont permis que de proposer des potentiels composés entrainant la répartition entre des racines dites tolérantes.

Il est possible de départager les émissions en COVs des parties racinaires en fonction du caractère sensible et tolérant des plants. La coumarine et la 7-méthoxycoumarine semblent être des marqueurs de plants tolérants alors la pipéritone est significativement plus émise par les plants sensibles. Cependant, le caractère sensible/tolérant n'est pas bien défini [24]. Il faudrait augmenter le nombre de variétés par espèce pour mieux caractériser la sensibilité et la tolérance des plants avant de chercher à identifier des marqueurs spécifiques de sensibilité ou de tolérance.

II.4. Perspectives

II.4.1. Différence de signatures chimiques entre plants sains et infectés

La stratégie développée pourrait être exploitée dans le cadre d'un problème écologique impliquant des interactions chimiques entre racines et insectes, telles que les interactions possibles entre lavandes et larves de cicadelle. Il serait intéressant d'appliquer cette méthodologie sur des racines saines et infectées par le phytoplasme. En juillet 2018, des échantillons de racines ont été prélevées, sur le plateau de Sault, sur un plant de lavandin *grosso* asymptomatique et un plant symptomatique (variété tolérante) situés tous les deux en bord de parcelle. Une fois coupées, les racines ont été trempées dans de l'azote liquide et congelées dans la carboglace pour le transport. En laboratoire, trois extraits de racines asymptomatiques et symptomatiques, broyées dans de l'azote liquide, ont été réalisés. Les extractions et analyses ont été réalisées toujours selon la méthode décrite en partie II.2.



Figure II-10. Chromatogrammes des composés détectés par HS-SPME GC-MS (60 min à 70°C, fibre DVB/CAR/PDMS) sur les parties racinaires de lavandin *grosso* asymptomatique (noir) et symptomatique (orange). Les numéros font références aux COVs cités dans le Tableau II-5.

Les profils chromatographiques obtenus sont pauvres, peu de molécules ont été extraites et celles détectées sont difficiles à identifier en raison de leur faible abondance, du bruit de fond important et de la saturation de la coumarine (Figure II-10). Le faible nombre de molécules détectées peut être du aux échantillonnages différents entre les racines prélevées sur le terrain et les racines prélevées sur plant en pot ainsi que l'âge différents des plants :

- Seules des racines secondaires ont été prélevées sur les parties racinaires de lavandin grosso accessibles sur le terrain pour éviter d'arracher les plants contrairement aux racines prélevées sur des plants en pot. L'hypothèse est que les racines secondaires issues de la racine principale peuvent être moins riches en COVs.
- La collecte de racines sur le terrain a nécessité un trempage dans l'azote liquide ainsi que le transport dans de la carboglace du lieu d'échantillonnage au laboratoire. Les échantillons ont pu se dégrader lors du délai entre collecte et analyse en laboratoire.

Vingt-cinq composés différents ont toutefois pu être détectés et identifiés suite aux analyses HS-SPME GC-MS sur les racines broyées de lavandin *grosso* asymptomatique (21 composés) et symptomatique (23 composés) (Tableau II-5).

Certains composés présentent des différences d'abondance entre les émissions des racines asymptomatique et symptomatique. C'est le cas de la fenchone (13) qui est sur-exprimée par les racines asymptomatiques (9,56 \pm 0,56 % > 0,74 \pm 0,15 %). Inversement, le 1,8-cinéole (8) et le camphre (16), d'après les profils en Figure II-10 ainsi que les pourcentages moyens (Tableau II-5), sont plus émis par les racines symptomatiques (respectivement 5,46 \pm 0,6 % > 0,25 \pm 0,16 % et 8,71 \pm 0,96 % > 2,12 \pm 0,52 %). D'après la littérature, une libération rapide de 1,8-cinéole par des racines d'*Arabidopsis* a été observée en réponse à l'action de pathogènes tels que la bactérie *Pseudomonas syringae* ou l'insecte *Diuraphis noxia* [244].

Ces essais n'ont été réalisés que sur deux plants différents, ce ne sont que des hypothèses qui semblent intéressantes à approfondir dans le cadre d'études postérieures réalisables sur un plus grand nombre d'échantillons de racines de plantes saines et infectées.

NI ^o	IR (cole)	IR (litt.)	Composé	Aire (% ± SD) ^[a]		
IN	IR (Calc.)		compose	(A)	(S)	
1	941	949	camphène	-	0,26 ± 0,02	
2	954	956	trans-2-heptanal	1,35 ± 0,16	1,64 ± 0,65	
3	961	961	benzaldéhyde ^[b]	1,79 ± 0,26	0,45 ± 0,34	
4	984	975	3-octanone	0,28 ± 0,27	0,72 ± 0,46	
5	988	978	2-pentylfurane	-	1,39 ± 0,62	
6	1018	1017	o-cymène	-	3,26 ± 0,69	
7	1022	1020	limonène	0,27 ± 0,05	-	
8	1024	1023	1,8-cinéole	0,25 ± 0,16	5,46 ± 0,6	
9	1036	1041	2-hydroxybenzaldéhyde	0,49 ± 0,1	1,31 ± 1,4	
10	1059	1062	acétophénone	1,25 ± 0,25	1,59 ± 0,43	
11	1069	1073	1-octanol ^[b]	0,15 ± 0,04	0,2 ± 0,08	
12	1075	1087	déhydro p-cymène	-	0,26 ± 0,04	
13	1079	1096	fenchone	9,56 ± 0,56	0,74 ± 0,15	
14	1101	1102	nonanal ^[b]	0,22 ± 0,03	0,85 ± 0,54	
15	1105	1121	fenchol	1,72 ± 0,5	1,42 ± 0,89	
16	1131	1145	camphre	2,12 ± 0,52	8,71 ± 0,96	
17	1142	1146	<i>(E,E)</i> -2,6-nonadiénal ^[b]	0,12 ± 0,03	-	
18	1153	1162	bornéol ^[b]	2,09 ± 0,53	3,04 ± 0,77	
19	1166	1168	3-éthyl-benzaldéhyde	1,02 ± 0,1	1,85 ± 0,19	
20	1181	1187	salicylate de méthyle	2,43 ± 0,29	4,95 ± 0,8	
21	1210	1218	2-hydroxycinéole	0,42 ± 0,12	0,39 ± 0,11	
22	1230	1239	carvone	0,37 ± 0,03	0,21 ± 0,03	
23	1365	1361	dihydro-coumarine	0,5 ± 0,08	0,8 ± 0,13	
24	1423	1432	coumarine ^[b]	15,76 ± 6,25	13,83 ± 5,26	
25	1729	1732	7-méthoxycoumarine ^[b]	0,54 ± 0,21	0,11 ± 0,08	

Tableau II-5. Pourcentages relatifs des COVs identifiés par HS-SPME GC-MS sur des racines de lavandin *grosso* asymptomatiques (A) et symptomatiques (S).

^[a]Aire exprimée en pourcentage de la superficie totale.

^[b]COV identifié comme marqueur départageant des variétés sensibles de tolérantes (Tableau II-4). (A), asymptomatique. (S), symptomatique.

IR (calc.), indice de rétention calculé d'après les temps de rétention d'un mélange de n-alcanes (C6-C24).

IR (litt.), indice de rétention reporté dans la littérature (NIST, ESO).

SD, déviation standard.

-, absent.

Toutes ces expériences en laboratoire ont apporté une caractérisation des composés émis et/ou stockés par les racines de différentes variétés de *Lavandula sp* et des résultats encourageants sur la différenciation d'émissions racinaires entre elles. Or, cette diversité chimique observée en laboratoire n'est pas forcément représentative des émissions racinaires dans leur environnement naturel. Il est donc primordial de réfléchir au développement d'un dispositif pouvant être appliqué en plein champ.

II.4.2. Conception et évaluation de l'efficacité d'un dispositif de HS-SPME applicable sur le terrain (en serre ou en plein champ)

Etudier les COVs émis par les racines sur le terrain se révèle être un défi en raison principalement de leur accessibilité dans le sol. C'est pourquoi, pour pouvoir étudier les COVs émis par les racines de lavande/lavandin directement sur le terrain, il a fallu concevoir un dispositif d'échantillonnage en créant un espace de tête dans le sol à proximité des racines. L'objectif était de créer un dispositif utilisant la SPME pour comparer aux études préalables en laboratoire. Ainsi, le dispositif utilisé a été élaboré de la manière suivante (Figure II-11) :

- Un vial headspace en verre (40 mL) dont le fond (la partie basse) a été découpé avec une scie à diamant. La partie haute du vial est fermée par un bouchon contenant un septum et servant de support à la fibre SPME lors de l'échantillonnage pour éviter l'introduction d'organismes ou de COVs aériens.
- Du grillage métallique (10×10 cm) accroché au vial par un collier de serrage en inox servant à introduire le dispositif dans la terre et éviter le contact direct entre fibre et terre.



Figure II-11. Schéma du dispositif de HS-SPME développé pour étudier les COVs émis par les racines en pot (A) et photo de son application sur un plant de lavandin *grosso* (B).

Pour son application en pot, un trou d'environ 10 cm de profondeur est d'abord creusé à côté de la plante. Une fois le dispositif introduit, ce dernier est recouvert de terre ; seul le haut du vial est hors terre (2 cm). L'aiguille contenant la fibre est placée à chaque fois à la même hauteur pour faciliter la répétabilité des extractions (Figure II-11 (A)). La fibre de DVB/CAR/PDMS ayant apporté de meilleurs résultats sur les COVs de racines de lavandin *grosso* en laboratoire, a été utilisée pour des essais sur plant de lavandin *grosso* en pot (Figure II-11 (B)). Une extraction sur de la terre nue a été réalisée en même temps que l'extraction sur les racines de lavandin en pot et suivant le même protocole d'extraction.

• Optimisation de l'extraction

L'influence de la durée d'extraction a été réalisée en suivant l'abondance de trois molécules (fenchone, fenchol et 1,8-cinéole) à différents temps d'extraction (1, 2, 3, 4, 5 et 7h). D'après les résultats obtenus (Figure II-12), il s'avère que 4 h d'extraction soit nécessaire pour piéger les trois composés. Conclure sur ces tests réalisés en conditions extérieures est cependant difficile en raison de la forte variabilité observée entre les trois réplicats d'extraction. Cette variabilité peut être due au système d'étude non contrôlé (influence de paramètres environnementaux) ainsi qu'aux variations d'émissions durant le temps d'extraction long.



Figure II-12. Optimisation de la durée d'extraction de la fenchone (bleu), du fenchol (rouge) et du 1,8-cinéole (rose) détectés par HS-SPME GC-MS sur les racines de lavandin *grosso* en pot (Écart-type calculé à partir de triplicats).

• Analyses qualitatives et quantitatives (GC-MS/FID)

Après analyses en GC-MS/FID (Annexe 4), 31 composés ont pu être identifiés après extraction de 4h *in situ* (Tableau II-6). La fenchone, le fenchol, le 1,8-cinéole et le camphre semblent être les composés majoritairement émis par les racines dans le sol. Parmi les 31 composés identifiés sur les racines en pot, seuls 9 sont communs à ceux identifiés en laboratoire : 8 monoterpènes oxygénés (fenchone, linalol, fenchol, camphre, bornéol, terpinène-4-ol, α -terpinéol, *trans*-carvéol) et 1 monoterpène hydrocarboné (γ -terpinène).

D'après la Figure II-13, même si les profils entre les racines analysées en laboratoire et celles sur le terrain présentent un décalage dans les temps de rétention en raison de l'utilisation de colonnes apolaires différentes, les profils obtenus sur le terrain étaient pauvres en composés comparés aux profils obtenus sur les racines en laboratoire. Cela était prévisible en raison notamment de la température moyenne dans la terre qui était bien plus faible (17,7 ± 3,5°C) que celle choisie et optimisée en laboratoire (70°C). De plus, la température du sol peut varier en fonction des conditions climatiques (taux d'humidité, température), ce qui peut modifier le taux de COVs émis par la rhizosphère et le sol [198].

Sur la Figure II-13, un profil GC-MS d'un « blanc terre » a été représenté après extraction dans un pot contenant de la terre de rempotage constituée de fumier de cheval, d'herbe coupée et de déchets verts (identique à celle utilisée pour les pots de lavandin). Il permet d'indiquer que les composés identifiés lors des extractions sur racines de lavandin étaient bien émis par les racines et non par la terre. Les composés sortant en fin d'analyse (après 50 minutes), sont principalement des acides carboxyliques tels que l'acide palmitique mais aussi des dérivés de phtalates qui peuvent provenir des pots en plastique ainsi que des dérives de morpholine pouvant provenir de produits phytosanitaires. Il est à noter que ces composés peuvent influencer le piégeage des COVs émis par les racines et donc avoir un impact sur l'analyse.



Figure II-13. Chromatogrammes des composés détectés par HS-SPME GC-MS (fibre DVB/CAR/PDMS) sur des racines intactes de lavandin *grosso* après extraction de 60 min à 70°C en laboratoire (A), ou après 4 h d'extraction dans la terre seule (noir) ou avec racines (vert) sur le terrain (B).

				Aire (% ± SD)	Aire (% ± SD)		
N°	Molécule	IR (calc.)	IR (lit.)	GC-MS	GC-FID		
1	α-pinène	936	938	0,13 ± 0,05	0,47 ± 0,26		
2	sabinène	972	968	0,32 ± 0,13	0,36 ± 0,25		
3	3-octanone	975	965	0,19 ± 0,15	-		
4	β-pinène	977	970	0,54 ± 0,14	2,37		
5	acide hexanoïque_	986	981	0,2 ± 0,02	1,34 ± 0,64		
6	myrcène	990	991	0,27 ± 0,09	-		
7	3-octanol	994	995	0,17 ± 0,02	-		
8	α -phellandrène	1003	997	0,19	0,63 ± 0,04		
9	3-carène	1012	1012	1,17 ± 0,77	1,11 ± 0,35		
10	1,8-cinéole	1028	1033	6,79 ± 1,5	16,86 ± 1,48		
11	<i>(Z)</i> -β-ocimène	1044	1046	0,1	0,94 ± 0,22		
12	<i>(E)</i> -β-ocimène	1055	1051	0,11	0,19 ± 0,07		
13	ɣ-terpinène ^[a]	1065	1064	0,09	-		
14	fenchone ^[a]	1075	1075	47,91 ± 2,94	47,09 ± 10,91		
15	linalol ^[a]	1096	1086	0,35	1,70 ± 0,18		
16	2-phényléthanol	1106	1099	0,16 ± 6,97	0,23 ± 0,07		
17	fenchol ^[a]	1120	1121	14,87 ± 7,39	9,41 ± 3,02		
18	acide 2 éthyl-hexanoïque	1127	1123	0,26 ± 4,07	-		
19	camphre ^[a]	1137	1145	13,66 ± 3,87	10,72 ± 3		
20	pinocarvone	1149	1138	0,36 ± 0,1	0,13 ± 0,03		
21	bornéol ^[a]	1160	1162	3,74 ± 0,87	2,04 ± 0,95		
22	terpinène-4-ol ^[a]	1172	1172	0,66 ± 0,1	0,98 ± 0,22		
23	acide octanoïque	1176	1180	0,22 ± 2,87	2,07 ± 0,56		
24	trans-dihydrocarvone	1190	1186	0,23 ± 0,88	0,4 ± 0,2		
25	α-terpinéol ^[a]	1193	1191	0,47 ± 0,21	1,41 ± 0,42		
26	trans-carvéol ^[a]	1210	1217	0,19 ± 0,05	1,18 ± 0,74		
27	2-méthylbutyrate d'hexyle	1237	1236	0,11 ± 0,02	0,26 ± 0,05		
28	acétate d'α-terpinyle	1342	1353	0,12	0,12		
29	longifolène	1417	1413	0,18 ± 0,04	-		
30	β-caryophyllène	1424	1423	$0,11 \pm 0,01$	0,31 ± 0,09		
31	ɣ-cadinène ^[a]	1514	1519	0,1 ± 0,64	0,08 ± 0,01		

Tableau II-6. COVs identifiés par HS-SPME GC-MS/FID (4h, fibre DVB/CAR/PDMS) sur les racines de *L. x intermedia* variété *grosso* en pot.

Aire exprimée en pourcentage par rapport à l'aire totale.

^[a] identifié lors de l'étude sur les COVs émis par les racines en laboratoire (Table II-2).

IR (calc.), indice de rétention calculé en fonction des temps de rétention d'un mélange d'alcanes C_6 - C_{24} . IR (lit.), indice de rétention référencé dans la littérature (NIST, ESO).

SD, déviation standard.

-, absent.

Conclusion

Cette stratégie longue développée en extérieur semble être beaucoup moins sensible que celle développée en laboratoire (Figure II.8). De plus, les résultats obtenus avec la fibre DVB/CAR/PDMS sont très variables ce qui n'est pas en accord pour des études en plein champ. Or la répétabilité devrait être testée sur d'autres fibres avant de conclure sur la non-adaptabilité de l'extraction HS-SPME GC-MS dans l'obtention de résultats répétables utilisables dans le cas d'études métabolomiques en plein champ.

Il est aussi difficile d'étudier les COVs émis par les racines directement dans le sol, puisque le sol lui-même est un réservoir de COVs formés notamment à partir de la litière en décomposition [198]. Malgré ces inconvénients, la méthode employée, facile à mettre en œuvre, a permis d'analyser les COVs émis par les racines de lavandin *grosso* dans le sol.

II.4.3. Essais d'extractions en espace de tête dynamique applicables sur le terrain (en serre ou en plein champ)

Pour améliorer le piégeage des COVs émis par les racines, des tests d'extraction en espace de tête dynamique (DHS) ont été réalisés sur les racines de lavandin grosso en pot à l'aide d'une pompe aspirante Tecora et de tubes Tenax® TA (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA). Avant utilisation, les tubes Tenax ont été préalablement conditionnés pendant 1 h à 300°C. Le même support utilisé précédemment pour la SPME (Figure II-11) a servi à la conception du dispositif employé dans le cas de l'extraction DHS pour créer un espace de tête dans le pot et permettre l'insertion du piège dans la terre (Figure II-14). Les COVs entrainés par le flux d'air ont été adsorbés sur de l'oxyde de poly-(2,6-diphényl)p-phénylène contenu dans les pièges et analysés en laboratoire suivant la méthode décrite en Annexe 5. Uniquement une dizaine d'essais avec différents débits et durées a été réalisée, et n'a pas apporté de profils chromatographiques interprétables (beaucoup de bruit de fond). Le principal intérêt d'utiliser l'extraction DHS à la place de la SPME était de diminuer le temps d'extraction long en ajoutant le paramètre de la pompe forçant les COVs à être piégés. Les durées testées étaient comprises entre 15 et 90 minutes et les flux variaient de 50 à 200 mL/min. Or, les racines n'émettant que peu de composés dans le sol [198], le choix de durées inférieures à 90 minutes n'était peutêtre pas judicieux et des essais de 4 h d'extraction auraient dû être faits pour comparer avec les résultats obtenus à l'aide de la SPME.



Figure II-14. Schéma du dispositif d'extraction en espace de tête dynamique réalisé sur un plant de lavandin *grosso* (pompe Tecora, tube Tenax) (A) et photo de son application (B).

Dans l'article de Delory *et al.* (2006), deux dispositifs expérimentaux ont été décrits pour étudier les COVs racinaires intervenant dans les interactions plantes/plantes [203]. L'idée est de développer un dispositif semblable pour étudier les COVs émis par les racines de lavande et lavandin en pot (Figure II-15). Un courant d'air continu réglé par un débit d'air entrant (pompe soufflante) ainsi qu'un débit sortant (pompe aspirante) aiderait à entraîner les composés volatils émis par les racines. L'utilisation d'un tube en Teflon perforé placé avant la croissance des racines a pour but d'éviter de perturber la croissance des racines mais de les exposer tout de même au passage de ce flux constant par leur présence entre les trous. En entrée du pot, un filtre à charbon pourrait être placé pour purifier l'air et en sortie un piège serait ajouté pour fixer les COVs.



Figure II-15. Schéma d'une proposition de dispositif d'extraction en espace de tête dynamique réalisable sur un plant de lavandin *grosso* en pot.

De la même façon que pour les études réalisées en laboratoire (section II.2), divers paramètres sont à tester et optimiser. Les facteurs qui seraient à prendre en compte pour les piégeages par DHS sont : l'heure d'extraction (allant de 10 h à 16 h par exemple), la durée d'extraction (de 30 à 120 min), les débits entrant et sortant (de 50 à 200 mL/min) ainsi que le type d'adsorbant employé tels que Porapak Q, Tenax TA, Carbotrap ou encore Carboxen [144]. Un plan d'expérience peut être mis en place pour diminuer la quantité de piégeages à réaliser. En effet, en prenant 5 facteurs à chacun 4 niveaux (5⁴), tester tous les paramètres reviendrait à réaliser 625 expériences. Par le plan d'expérience présenté en dans le Tableau II-7, l'influence des différents facteurs peuvent être mesuré à partir de seulement 16 expériences, ce qui peut être réalisé en une semaine. Il existe des logiciels permettant de réaliser les statistiques sur ces plans d'expérience ou une programmation excel permet également d'extraire les informations [245].

Nº d'ovnórionco	Facteur (niveau)							
N d'experience	heure (h)	durée (min)	débit entrant (mL/min)	débit sortant (mL/min)	adsorbant			
1	10 (1)	30 (1)	50 (1)	50 (1)	Porapak Q (1)			
2	10 (1)	60 (2)	100 (2)	100 (2)	Tenax TA (2)			
3	10 (1)	90 (3)	150 (3)	150 (3)	Carbotrap (3)			
4	10 (1)	120 (4)	200 (4)	200 (4)	Carboxen (4)			
5	12 (2)	30 (1)	100 (2)	150 (3)	Carboxen (4)			
6	12 (2)	60 (2)	50 (1)	200 (4)	Carbotrap (3)			
7	12 (2)	90 (3)	200 (4)	50 (1)	Tenax TA (2)			
8	12 (2)	120 (4)	150 (3)	100 (2)	Porapak Q (1)			
9	14 (3)	30 (1)	150 (3)	200 (4)	Tenax TA (2)			
10	14 (3)	60 (2)	200 (4)	150 (3)	Porapak Q (1)			
11	14 (3)	90 (3)	50 (1)	100 (2)	Carboxen (4)			
12	14 (3)	120 (4)	100 (2)	50 (1)	Carbotrap (3)			
13	16 (4)	30 (1)	200 (4)	100 (2)	Carbotrap (3)			
14	16 (4)	60 (2)	150 (3)	50 (1)	Carboxen (4)			
15	16 (4)	90 (3)	100 (2)	200 (4)	Porapak Q (1)			
16	16 (4)	120 (4)	50 (1)	150 (3)	Tenax TA (2)			

Tableau II-7. Exemple de plan d'expérience de 5 facteurs à 4 niveaux (d'après la méthode Taguchi).

II.5. <u>Conclusion</u>

Il existe actuellement peu d'informations sur les COVs présents dans le sol [198]. Aucune étude ne fait d'ailleurs référence aux COVs émis par les racines de lavande et lavandin. Dans le contexte du dépérissement de la lavande, l'insecte vecteur de la bactérie pathogène réalise son cycle de vie complet sur les lavandes et son développement larvaire à lieu dans le sol au niveau des racines (partie I.2.3).

Ainsi, dans ce chapitre, des études sur les COVs racinaires, que ce soit en laboratoire pour étudier la chimie des racines ou *in situ* dans le but d'avoir une représentation plus réaliste des émissions, ont été réalisées par différentes approches.

Après optimisations de l'extraction et de l'analyse des composés racinaires en laboratoire par HS-SPME GC-MS, une diversité de familles de COVs dont 40 monoterpènes, 15 sesquiterpènes, 1 diterpène et 2 coumarines a pu être détectée. Les émissions de différentes variétés de racines sensibles ou tolérantes ont ensuite été comparées. Une répartition des échantillons en deux groupes distincts sensible/tolérant a pu être mise en évidence. 25 composés sont ressortis comme discriminants dont un seul était significativement plus émis par des racines sensibles (pipériténone).

Pour avoir une meilleure estimation des émissions racinaires dans le sol, un défi était de pouvoir mettre en place une méthode d'extraction applicable sur le terrain. Un dispositif utilisant l'extraction HS-SPME a été conçu pour étudier les émissions racinaires sur plants de lavandin *grosso* en pot. Or seulement une trentaine de COVs ont pu être détectés par GC-MS suite à l'utilisation de ce dispositif de piégeage.

Par ces études réalisées en laboratoire mais également sur le terrain, la diversité chimique des COVs racinaires de lavande et lavandin a pu être caractérisée pour la première fois. Ces résultats novateurs apportent de nombreuses perspectives notamment dans la différenciation d'émissions racinaires en fonction de différentes variétés mais aussi sur le développement d'un dispositif pouvant permettre de piéger les COVs sur le terrain. Ce dernier point est d'autant plus intéressant puisque peu d'études se rapportent à ce jour aux diffusions de COVs dans le sol. Des essais d'amélioration à l'aide de l'extraction DHS associée à l'analyse en GC-MS sont à approfondir dans le but de proposer une méthode sensible, rapide et applicable sur le terrain permettant de mieux évaluer quels sont les COVs émis par les racines de lavande, d'identifier des marqueurs chimiques pouvant être impliqués dans le dépérissement de la lavande et départageant des émissions entre plants sensibles/tolérants, symptomatiques/asymptomatiques ou sains/infectés.

Chapitre III.

Étude de la variabilité chimique des COVs émis par les parties aériennes de lavande et lavandin en plein champ

Chapitre basé sur la publication :

STIERLIN É., NICOLÈ F., COSTES T., FERNANDEZ X., MICHEL T. Metabolomic study of volatile compounds emitted by lavender grown under open-field conditions: A potential approach to investigate the yellow decline disease. *Metabolomics*, 2020; 16 (31).



III.1. Problématique

Lors de la floraison de la lavande, les cicadelles adultes viennent se nourrir de la sève élaborée et transmettent le phytoplasme de stolbur aux plantes (Figure I-6). L'évolution des symptômes peut être séparé en quatre niveaux (Tableau I-3) : (1), plantes sans symptômes ; (2), plantes légèrement jaunissantes, avec moins de hampes florales ; (3), plantes n'ayant presque pas de tiges florales, mais avec quelques feuilles; (4), plantes mortes, sans hampes florales et sans feuilles vertes. L'objectif de ce chapitre est de voir si les émissions en COVs des parties aériennes des plants sont modifiées en fonction des symptômes du dépérissement de la lavande et de mettre en avant des composés susceptibles de provoquer une différence de comportements attractifs ou répulsifs à la cicadelle. En effet, les variations d'émissions modifient les informations perçues par l'insecte vecteur qui utilise les COVs pour localiser les lieux de nourriture et/ou de ponte [22, 33]. De plus, dans le cas de la lavande et du lavandin, il est reporté que la composition chimique en COVs des fleurs évolue en fonction de leur maturité [116]. Les terpénoïdes (Z)- β -farnésène, β -caryophyllène, germacrène D, acétate de lavandulyle et acétate de linalyle, préférentiellement produits dès l'ouverture des fleurs, pourraient servir d'attractifs pour les pollinisateurs mais également pour les cicadelles. Parmi ces 5 composés, seuls le (Z)- β -farnésène et le β -caryophyllène induisent une réponse antennaire chez H. obsoletus d'après Riolo et al. (2012) [32]. Ces deux composés sont connus pour agir dans des phénomènes de défense des plantes [246, 247]. Mayer et al. (2008) ont montré notamment que le psylle du pommier est capable de distinguer l'odeur des pommiers sains, de celle des pommiers infectés au phytoplasme, Candidatus Phytoplasma mali. L'insecte était préférentiellement attiré par les arbres infectés qui libèrent des quantités plus élevées de β -caryophyllène que les arbres non infectés. Le phytoplasme modifie à la fois la plante en produisant un composé attractif et le comportement du psylle, insecte vecteur, pour permettre une meilleure dissémination de la bactérie.

Pour étudier les émissions en COVs de lavande et lavandin, une méthode d'extraction DHS a été utilisée sur les parties aériennes de plants asymptomatiques et symptomatiques localisés en champ, puis les COVs ont été analysés en laboratoire par ATD-GC-MS. La notion de « parties aériennes » regroupe les inflorescences ainsi que les feuilles les plus hautes sur les tiges qui ont été utilisés pour les piégeages.

Notre étude a pour but de voir s'il existe des différences d'émissions entre des plants de lavande et lavandin asymptomatiques/symptomatiques, sains/infectés par le phytoplasme et de répondre aux questions suivantes :

- (i) Comment étudier et caractériser les COVs émis par les parties aériennes de lavande et lavandin en plein champ ? (III.2)
- (ii) Est-ce que le bouquet d'odorants est similaire d'une année sur l'autre ? (III.3.3)
- (iii) L'infection des plantes par le phytoplasme induit-elle une modification du bouquet de COVs ? (III.3.4)

III.1.1. Établissement d'un cahier des charges détaillant les contraintes de piégeage des COVs sur le terrain

Comme évoqué dans le chapitre précédent (chapitre II), les études sur le terrain doivent tenir compte des contraintes inhérentes au piégeage des COVs en écologie. Ces contraintes peuvent être classées en trois principaux critères :

1) Réaliser des extractions sur un modèle vivant

Dans le cadre d'expériences en écologie chimique, le matériel d'étude est vivant et évolue au cours du temps. De plus, les stress abiotiques (température, lumière, composition atmosphérique) et biotiques (herbivores, pathogènes) influencent les émissions de COVs [202]. En milieu artificiel en laboratoire, ces facteurs peuvent être contrôlés, ce qui n'est souvent pas le cas en milieu naturel. Pour tenir compte des facteurs environnementaux, des contrôles par piégeage d'air ou des mesures physiologiques peuvent être réalisées en parallèle tels que la mesure d'échanges gazeux (informations sur la photosynthèse, la respiration ou la transpiration des plantes).

Il est préférable également de ne pas détruire ou perturber l'insecte et la plante que ce soit dans son environnement naturel ou artificiel (ne pas la déplacer ou l'isoler de son environnement). Le but est d'avoir une illustration des émissions en COVs la plus représentative de la réalité.

2) Étudier de nombreux échantillons

En écologie, il est important de réaliser de nombreux réplicats pour tenir compte au maximum l'influence de la variabilité biologique notamment. De plus, ce nombre est à multiplier en fonction des différents traitements à comparer. Ainsi, pour réussir à tout faire, il est nécessaire de minimiser le temps d'extraction, de réaliser des piégeages simultanés sur plusieurs plantes en parallèle et également de disposer d'une automatisation du dispositif d'extraction. Il faut également penser à la praticité de la méthode à utiliser sur le terrain : facilité de transport, robustesse aux conditions de l'étude (chaleur ou humidité), sans nécessité d'énergie telle que l'électricité.

La notion de coût et de facilité de fabrication/réparation doit aussi être prise en compte s'il devient essentiel d'avoir besoin de plusieurs systèmes ou s'il faut transporter des pièces pour une réparation en urgence.

3) Sensibilité

La connaissance du matériel d'étude intervient aussi dans le cahier des charges. En effet, suivant la plante, les parties de plantes (feuilles, fleurs ou racines par exemple), les molécules émises ne sont pas les mêmes. L'appareil d'extraction doit être adapté au matériel biologique étudié pour piéger le plus de composés possibles (aspect qualitatif). Il doit également être sensible pour retenir autant les composés très abondants que ceux à l'état de traces (aspect qualitatif). Or, ces informations qualitatives et quantitatives ne sont pas toujours connues et

le dispositif mis en place doit pouvoir être adapté au piégeage d'une large gamme de composés. Pour identifier la méthode optimale, des pré-expériences sont nécessaires.

4) Répétabilité et reproductibilité

Il est également nécessaire de prendre en compte un maximum de paramètres environnementaux qui peuvent varier en fonction du temps. La constance de ces paramètres apporte une meilleure répétabilité mais également reproductibilité des extractions et permet ainsi de comparer des données plus précisément.

Ces critères définissent un cahier des charges permettant de déterminer la ou les techniques les mieux adaptées à l'étude. Il n'existe pas de technique d'extraction universelle applicable à une plante donnée (Partie I-6) [144]. Cependant, en fonction des contraintes écologiques fixées, les méthodes d'extraction uniquement adaptées à des études en laboratoire peuvent être rejetées (systèmes d'adsorption par aiguille ou microextraction sur goutte de solvant par exemple). De plus, pour avoir une bonne répétabilité d'extraction, les dispositifs non commerciaux ne peuvent être utilisés (tubes de silicone ou bandes adhésives de PDMS). Face à la SPME couramment employée, les techniques en espaces de tête dynamiques utilisant un flux d'air contrôlé semblent plus intéressantes en raison de leur forte sensibilité et de la réalisation de multi-prélèvements.

III.1.2. Conception d'un dispositif d'extraction DHS six voies applicable sur le terrain

Pour avoir une représentation réaliste des COVs émis par les plantes et potentiellement détectés par les insectes, la collecte des composés est à effectuer sur le terrain. Le but est de pouvoir piéger et caractériser les COVs émis par les parties aériennes de lavande fine et de lavandin ainsi que pouvoir différencier des plantes en fonction de leur statut symptomatique/asymptomatique et de leur caractère sensible/tolérant.

Pour isoler les parties aériennes des différents plants, il était nécessaire de créer une chambre d'enfermement qu'un flux d'air traversait dans le but d'entraîner les COVs émis. Il a été choisi d'isoler 15 parties aériennes de chaque plant.

Le dispositif d'échantillonnage (Figure III-1) utilisé dans le cadre de cette étude est un système développé par Frédéric Jullien et Florence Nicolè (LBVpam), et a montré son efficacité dans le cadre de précédentes études [248]. La liste du matériel nécessaire à sa fabrication est détaillée en Annexe 6. Il est conçu de la manière suivante :

 Une structure de fixation formée à partir de quatre faces en plexiglas, matériau résistant et plus léger que le verre. Les plaques ont été percées pour fixer les débitmètres reliés aux tuyaux permettant le passage d'air. A chaque connexion, du scotch Téflon en PTFE (polytétrafluoroéthylène) a été utilisé pour assurer l'étanchéité entre les raccords.

- Des sacs en Nalophan®, plastique inerte pour créer un espace de tête autour des parties aériennes de plants asymptomatiques ou symptomatiques. Ce type de sac en PET (poly(téréphtalate d'éthylène)) a été choisi en fonction de ses avantages décrits dans la littérature (neutre, bon marché, facile à utiliser, adapté pour ensacher des plantes) [249].
- Des régulateurs de flux (douze débitmètres) permettant de réaliser six extractions en parallèle (six débits entrants et six débits sortants réglés indépendamment). Les débitmètres fonctionnent avec un flotteur qui permet un réglage précis du débit. Dans un tube gradué, la bille est poussée vers le haut par un flux gazeux. Une échelle sur le tube permet la lecture du débit de gaz. Ces débitmètres sont considérés comme robustes, petits et donc faciles à transporter pour des mesures sur le terrain. Ils peuvent être combinés à des flotteurs de différents matériaux (verre, inox, saphir, tantale, carboloy) ce qui permet de moduler les gammes de mesure de flux. Pour le dispositif DHS six voies, les billes Carboloy (densité : 14,98 g/mL) ont été utilisées car elles font varier les flux d'air de 30 à 432 mL/min. Dans notre étude, les débits d'air entrants ont été réglés à 130 mL/min (2017) ou 90 mL/min (2018) sur les débitmètres ce qui équivaut respectivement à 355 mL/min et 218 mL/min. Les débits sortants, fixés à un plus faible débit pour créer une surpression dans le sac, ont été réglés à 110 mL/min (2017) ou 70 mL/min (2018), soit 282 mL/min et 152 mL/min en réalité. Les débits ont été fixés d'après une étude utilisant le même type de dispositif d'extraction en espace de tête dynamique pour piéger les COVs émis par les figues dans le jardin botanique tropical de Xishuangbanna en Chine (débit d'entrée de 400 mL/min et débit de sortie de 300 mL/min) [248].
- Deux pompes, une soufflante et une aspirante pour générer un flux d'air entrant dans le système et un flux d'air sortant. Ces pompes sont de petites tailles et sont supposées silencieuses et présentant de faibles vibrations, ce qui présente un intérêt pour des études en milieu naturel. Deux batteries rechargeables permettent le fonctionnement des pompes.
- Un filtre à charbon actif disposé en entrée pour purifier l'air entrant ainsi que l'utilisation de petits filtres supplémentaires à chaque entrée des chambres d'espace de tête.
- Un piège Tenax TA situé en sortie de l'espace de tête. Ce piège, composé d'oxyde de poly-(2,6-diphényl)-p-phénylène, polymère poreux, a été choisi pour sa large gamme de piégeage (C₇ à C₂₆), sa stabilité à haute température, sa faible affinité avec l'eau et sa durée de vie importante [144, 250, 251]. De plus, ce type d'adsorbant est souvent utilisé pour piéger les COVs issus de plantes [144, 252]. Après échantillonnages, les tubes ont été analysés en laboratoire par ATD-GC-MS (Partie I.7.1).



Figure III-1. Photo du dispositif d'échantillonnage utilisé en champ et mis en place au sein de l'ICN (A) ainsi que son schéma (B).

III.2. Étude métabolomique 2017 sur les COVs de lavande et lavandin cultivés en plein champ

Ce travail a donné lieu à une publication publiée en février 2020 dans le journal *Metabolomics* et insérée ci-dessous. Le but de l'article était d'utiliser une approche métabolomique pour mettre en évidence les différences d'émissions chimiques des plantes asymptomatiques et symptomatiques et ainsi mieux comprendre les interactions entre la plante hôte, insecte vecteur, bactérie pathogène et environnement. Les principaux résultats obtenus sont résumés à la suite de l'article, en section III.2.2.

III.2.1. Approche métabolomique développée en 2017

Published in Metabolomics (Vol. 16, N°31, 2020)

Metabolomic study of volatile compounds emitted by lavender grown under open-field conditions: a potential approach to investigate the yellow decline disease

Émilie Stierlin^a, Florence Nicolè^b, Thomas Costes^c, Xavier Fernandez^a, Thomas Michel^a* ^aUniversité Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice UMR 7272, 06108 Nice, France ^bUniversité de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire BVPAM, FRE CNRS INEE 3727 – EA 3061, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42000 Saint-Étienne, France ^cCentre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales (CRIEPPAM), Les Quintrands, Route de Volx, 04100 Manosque, France

*Corresponding author. Tel.: +33 4 89 15 01 37; fax: +33 4 92 07 61 89 12 E-mail address: Thomas.MICHEL@univ-cotedazur.fr

Co-authors e-mail addresses:

Émilie Stierlin: Emilie.STIERLIN@univ-cotedazur.fr Florence Nicolè: Florence.NICOLE@univ-st-etienne.fr Thomas Costes: Thomas.COSTES@crieppam.fr Xavier Fernandez: Xavier.FERNANDEZ@univ-cotedazur.fr

Abstract

Introduction Fine lavender and lavandin are perfume and medicinal plants originate from the South of France and are widely cultivated for their essential oils. Recently, cultivated plants suffered from a severe decline in France, due to the propagation of the yellow decline disease. This disease is caused by the stolbur phytoplasma, a bacterium transmitted by a sap-sucking insect, the planthopper.

Objectives In order to understand the complex relationships between host plant, pest, pathogen and environment responsible for the yellow decline of lavender, we use a

metabolomic approach to highlight changes in chemical emissions from asymptomatic ("healthy") and symptomatic ("infected") plants.

Methods Volatile compounds produced by fine lavender and lavandin were collected in the field using a dynamic headspace extraction approach. Afterwards, compounds trapped on Tenax adsorbent were thermodesorbed and analysed using an automated thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry (ATD-GC-MS). Multivariate statistical analyses were performed using principal component analysis and partial least square discriminant analyses.

Results The untargeted screening of volatiles allowed the separation of asymptomatic and symptomatic plants according to their emissions. The approach was sufficiently accurate so as to separate the emissions according to the different stages of infection. Twelve compounds were found to be deregulated metabolites of yellow disease infection, common to fine lavender (variety *7713*) and lavandin (variety *abrial*).

Conclusion The metabolomic approach allowed for the effective identification of chemical variations between infected and healthy plants in a complex field environment.

Keywords

Dynamic headspace extraction; GC-MS; Lavender; Metabolomic; Volatile organic compounds.

1 Introduction

Fine lavender (*Lavandula angustifolia* Miller) and its natural hybrid lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel), are Mediterranean Lamiaceae plants commonly cultivated for ornamental and medicinal use. These historical and emblematic crops of Provence (South of France) have been commercially grown since the beginning of the 20th century for extraction of their essential oils (EOs), which are extensively used in perfumery, cosmetics, food processing and aromatherapy [6]. In 2016, France was the world's second most important producer of fine lavender EO (100 tones) after Bulgaria (280 tones) [12]. France also produces the world's most important quantity of lavandin, totaling 1400 tones per year. Today, land used for lavandin cultivation utilizes a total of approximately 21,000 ha, while the land used for lavender cultivation amounts to only 5700 ha [13].

Over the last 20 years, lavender fields have suffered a severe decline in France due to the propagation of the yellow decline disease, combined with a higher frequency of severe drought in the production area. Yellow decline is associated with the presence of stolbur phytoplasma (*Candidatus* Phytoplasma solani), a cell wall-less bacterium, that develops in plant phloem and in the salivary glands of transmitting insects. The insect vector, a sap-sucking planthopper, *Hyalesthes obsoletus*, transmits phloem-restricted plant phytoplasma when feeding [19, 22]. The lavender/lavandin plants are highly affected by this disease because the insect carries out its complete life cycle on these plants. At the end of the summer, eggs are laid at the base of the plants, and when larvae emerge, they feed on plant roots during the winter. In the spring, the insect climb onto plant stems and become winged adults. During the

planthopper flight period (July/August), the bacterium is transmitted from lavender plant to lavender plant as the insect feeds [18]. Once introduced into a lavender plant, the phytoplasma obstructs the phloem-vessels where sap circulates. This results in typical symptoms of lavender decline, including yellowing of steam and leaves and a reduction of inflorescences (Figure III-2) resulting in early plant death (3-4 years longevity instead of 15-20 years), and consequently in a strong decrease in EO yields.



Figure III-2. Evolution of the symptoms of yellow decline on lavender under cultivation. Infection is rated in four stages: (1), plants without symptoms; (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes; (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves; (4), dead plants, no floral scapes and no green leaves (modified from CRIEPPAM).

In response to this phytoplasmose epidemic, prophylactic management methods used include elimination of infected plants, certification of healthy plant material and chemical control of the insect vector or of the pathogenic agent. In lavender, chemical control of the insect is impossible because the peak of adult flight coincides with peak flowering, when honeybees forage. Chemical treatment during this time would result in traces of insecticide in honey and EOs, an unacceptable possibility [196]. In addition, the use of antibacterial treatments in fields is forbidden in France. To date, there is no effective way to fight against this devastating lavender disease.

Yellowing and drying symptoms suggest a profound metabolism disturbance in phytoplasmainfected plants. Leaf yellowing is thought to be caused by a modification in carbohydrate synthesis and transport [20]. Photosynthesis is inhibited in many infected plants by a breakdown of chlorophyll and carotenoids synthesis, an alteration of electron transport and by the decreased activity of enzymes such as RuBPC [21]. comparison of global transcription profiles of healthy and infected grapevines by stolbur phytoplasma showed an alteration of the expression of genes involved in both primary and secondary metabolic pathways [253]. Several pathways leading to the production of flavonoid or terpene defense compounds are also affected in infected grapevines. Apple trees infected by *C*. Phytoplasma mali have been found to emit higher amounts of β -caryophyllene when compared to uninfected plants [247]. This compound attracts non-infected insects to infected plants while also attracting phytoplasma-infected insects towards healthy plants, thus promoting the spread of the bacterium. Phytoplasma has thus been shown to manipulate the behavior of its vector insect. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by plants play a crucial role in interactions with pathogens and insect vectors. Herbivore-Induced Plant Volatiles (HIPVs), released by attacked plants to attract parasitoids (the socalled 'plants crying for help' phenomenon), have also been shown to play the role of volatile defense compounds following insect attack [254–256]. Additionally, green leaf volatiles released by damaged plants signal to neighboring plants by triggering defense responses and may play a key role in plant-plant signaling and plant–insect interactions[257].

The use of metabolomics to analyse metabolites involved in defense and protection is becoming increasingly common in ecological studies [103]. Such approaches may be able to overcome some technical limitations, as all compounds are measured in a single step, without additional purification steps. The study of qualitative as well as quantitative differences between various treatments can help to understand the chemical signals involved in an ecological problem[99].

The present project proposes to use a metabolomic approach to highlight changes in chemical emissions from asymptomatic ("healthy") and symptomatic ("infected") plants. For comparative purposes one lavender variety (*7713*) and one lavandin variety (*abrial*), were investigated.

2 Materials and methods

2.1 Plant Material

Field sampling was carried out in Monieux (Vaucluse, région SUD-Provence-Alpes-Côte d'Azur) (Figure III-3). The plant emissions were collected during peak flowering season in July 2017, and again just before the lavender harvest. Peak flowering corresponded with the period of insect flight. Two distinct cultivars were analyzed: *7713* is a cultivar of fine lavender while *abrial* is a cultivar of lavandin. Seedlings were planted in 2011-2012 for fine lavender (Figure III-3A) and 2010-2011 for lavandin (Figure III-3B). Ten symptomatic and ten asymptomatic plants from each variety were selected and identified by CRIEPPAM (Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales, Manosque) based on their morphological aspects. For each symptomatic plant, the level of infection was noted from 1 (no symptom) to 4 (dead, see Figure III-2).



Figure III-3. View and GPS position of the *7713* fine lavender (A) and *abrial* lavandin (B) field in Monieux (France). Red points indicate where VOCs collection have been carried out.

2.2 Dynamic Headspace Extraction (DHS)

The VOCs produced by the plants were collected and characterized using dynamic headspace (DHS) analysis. Figure III-1 illustrates the DHS system used in this study, based on the system described by Proffit et al. (2008). The apparatus allows the sampling of five plants, plus one control, during each session. The control involved sampling, using the same procedure, in an empty bag. An inert 150 × 60 cm Nalophan[®] cooking bag (SIMACO, Metz, France) was used to enclose plants in the field because these polyethylene terephthalate bags are recommended to be inexpensive, easy to set up, and adapted to the enclosure of plants during VOC collection [249]. Each bag contained 15 aerial parts (inflorescences and some leaves) of the target plant and was supplied with a constant flow of air. A blower pump (N86 KNDC 12V, KNF Neuberger, Village-Neuf, France) pushed outside air through a charcoal filter, then through a divider which separated the airflow in six channels. The inlet flow was controlled by a flowmeter and passed through an ORBO 32 activated charcoal filter (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA) on the lower side of the bag enclosing the plant. The air was then ejected at the top of the bag through an adsorbent, by use of a suction pump. Regulated by flowmeters (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA), inlet and outlet airflows were respectively fixed at 350 mL/min and 280 mL/min in order to maintain a purified outdoor air inside DHS bag. The trap used for adsorption consisted of
stainless-steel tubes filled with Tenax[®] TA porous polymer, 60-80 mesh (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA), which was pre-conditioned at 300°C for 1 h. The sampling time was fixed at 60 min. After headspace extraction, enclosed aerial parts were cut and then frozen in liquid nitrogen (Air Liquide France Industrie, Saint Priest, France), stored in dry ice (Air Liquide France Industrie, Saint Priest, France), stored in dry ice (Air Liquide France Industrie, Saint Priest, France), and freeze-dried for 48 h using a Lyovac GT2 freeze dryer (G. Beyneix S.A., Marseille, France), in order to obtain the dry mass. The hermetically sealed tubes were stored in the laboratory freezer and analyzed 3 months after sampling.

2.3 Automated thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry (ATD-GC-MS)

2.3.1 Automated thermal desorption (ATD) of volatile compounds

VOC desorption was carried out by using a 350 automated thermal desorber (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Volatile compounds were desorbed under a 50 mL/min flow at 300 °C for 15 min (primary desorption) and then cryofocused on a Tenax TA trap at – 30 °C. This trap was heated to 300 °C at 40 °C/s, with the maximum temperature maintained for 10 min. The desorbed volatile compounds were transferred to the GC column through a fused-silica line heated at 300 °C. Inlet (transfer of a part of the sample from the tube to the trap) and outlet (transfer of a part to the GC column) split flows were fixed at 150 and 200 mL/min respectively (0.1% of sample injected).

2.3.2 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

The ATD 350 was connected to a gas chromatograph GC Clarus 680 coupled to MS Clarus SQ8T mass detector (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). The analyses were performed on an ELITE-5MS column (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). The oven temperature was programmed to first stay at 35 °C for 5 min, then to rise from 35 °C to 180°C at 1.5 °C/min, and then from 180 °C to 270 °C at 15 °C/min and then held at 270 °C for 5 min. The carrier gas, helium, flowed at a constant speed of at 1 mL/min. Mass spectra were recorded using the electronic ionization (EI) mode at 70 eV, scanning the m/z 40–450 range. Data acquisition were carried out using TurboMatrix[™] (Perkin-Elmer).

2.3.3 Identification of compounds

The identification of compounds involved the comparison of mass spectra with those recorded by internal or commercial mass-spectral libraries (NIST and Wiley) as well as the comparison of linear retention indices (LRI) with those in the literature (NIST, ESO). All identifications correspond to putatively identified compounds (level 2) because no standards were used in this study. Retention indices (RI) were calculated using a formula described by Van den Dool and Kratz, as well as according to the retention time of a standard n-alkanes C_5-C_{25} mixture (SUPELCO). 2 µL of alkane mixture, diluted to 0.1% in dichloromethane, was placed on glass wool in an empty tube and analysed by ATD-GC–MS according to the method described previously.

2.4 Statistical analyses

All statistical analyses were done on R v3.5.1 software (R Foundation, Institute for Statistics and Mathematics, Austria) (Annexe 17 and Annexe 18).

2.4.1 Spectra processing

Chromatographic data were exported to NetCDF format using DataBridge[™] MS software. To obtain the final matrix with samples in row and retention times in columns, data were aligned using eRah R package [258]. Raw sample data were classified into two folders: asymptomatic and symptomatic plants. m/z 73, 74, 75, 147, 148, 149, 207 and 208 were excluded for data processing, since these signals correspond mainly to siloxane derivatives. The parameters set for deconvolution were as follows: min.peak.width=4, min.peak.height=6000000, noise.threshold=2000000, and for alignment: min.spectra.cor=0.90, max.time.dist=20, mz.range=40:450. The minimum number of samples was set to 3 for the missing compound recovery step.

For each sample, we calculated a relative area by dividing the area of the compounds by the dry biomass and by the total area of all compounds detected in each sample.

2.4.2 Discriminant analyses

Principal component analysis (PCA) was used to represent all individuals using the *fviz_pca_ind* function (factoextra package). To separate chemical profiles between symptomatic and asymptomatic plants, a Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed with the *plsda* function of mixOmics R package [179], after centered logarithmic normalization with the *clr* function (Hotelling package). This transformation generally brings extreme values closer together to obtain smaller variables distribution. The performance of the PLS-DA model was evaluated using the *perf* function (mixOmics package). All compounds with a VIP (Variable Importance in Projection) score > 0.9 were considered (package RVAideMemoire).

2.4.3 Mean comparison for VIP compounds between aymptomatic and asymptomatic plants

Normality and homoscedasticity of the data were tested using a Shapiro and Levene test, respectively. For non-parametric compounds, Mann and Whitney tests were performed. The *multtest.gp* function of the RVAideMemoire package was used to give corrected p-value for each metabolite. The statistical significance level was fixed to 0.05.

3 Results and discussion

In this study, the emitted VOCs of 7713 fine lavender and *abrial* lavandin were investigated through an untargeted metabolomics approach to differentiate asymptomatic from symptomatic plants, defined by CRIEPPAM. To obtain a realistic picture of the VOC blend emitted by plants, which potentially targets planthoppers, VOC collection was carried out during a period corresponding with peak insect flight and peak lavender flowering, using portable DHS equipment (Figure III-1). Forty-eight extractions, including controls, were performed using this strategy. DHS parameters used for VOC sampling were fixed according to the literature: (i) Tenax sorbent was chosen for its ability to trap compounds with a wide volatility range, its high temperature stability, its low water affinity and its long shelf life [250, 251]. This type of adsorbent is the most commonly used to trap VOCs from various plant matrices [144, 252]. (ii) Extraction time and flow parameters were fixed based on previous studies conducted in the context of yellow decline disease [34]. The flows set at 350 mL/min (inlet flow) and 280 mL/min (outlet flow) are similar to those used with the same type of dynamic headspace device to trap fig VOCs in the Xishuangbanna Tropical Botanical Garden in the Yunnan province (China) (400 mL/min inlet flow and 300 mL/min outlet flow) [248].

ATD-GC-MS parameters were selected to obtain the best analytical condition for the analysis of all trapped lavender VOCs. A minimum flow rate of the outlet split (200 mL/min) and a gradient temperature varying from 35 to 270°C were required to inject and separate different molecule classes [6].

3.1 Chemical characterization of VOCs emitted by fine lavender and lavandin

The relative abundances of VOCs emitted by the two varieties is detailed in Table 1. The compounds emitted by the aerial parts of 7713 and *abrial* varieties can be grouped into four main categories: oxygenated monoterpenes, hydrocarbon monoterpene, acetates and hydrocarbon sesquiterpenes (Table III-1). A total of 50 compounds were identified in both plant species. Nine supplementary compounds, representing less than 3% of the total area, were detected and remained unidentified (Annexe 7).

Oxygenated monoterpenes were the most important class of compounds emitted by lavender (57.08 \pm 18.84%) and lavandin (62.39 \pm 38.12%). Among them, linalyl acetate (**35**) and linalool (**22**) were the main molecules. In terms of the hydrocarbon monoterpenes, (*Z*) and (*E*)- β -ocimene (18 and 19) were the major compounds identified in both varieties.

Out of the 50 VOCs detected in total, nine compounds have only been identified in 7713 fine lavender including acetate compounds (3-octanol acetate, neryl acetate or geranyl acetate), an oxygenated monoterpene (lavandulol), and a hydrocarbon sesquiterpene (α -santalene). Conversely, eight other compounds specific to *abrial* lavandin have been specifically detected, including four hydrocarbon sesquiterpene (α -bourbonene, epi- β -santalene, β -selinene and α -santalene).

The asymptomatic and symptomatic profiles of 7713 fine lavender samples are presented in Figure III-4. In Figure III-4, a lower abundance of compounds appears to be detected in 7713 fine lavender symptomatic plants (broken red lines). Indeed, as seen in Table III-1, the number of compounds decreases from 41 compounds for asymptomatic plants to 32 for symptomatic plants, with an important decrease in hydrocarbon monoterpenes ($34.58 \pm 19.24\%$ to $24.7 \pm 10.62\%$). However, emissions of oxygenated monoterpenes and hydrocarbon sesquiterpenes seem to increase in symptomatic plants. An increase in emissions is also observed for almost all chemical families present in the lavandin variety (except for alcohols and esters).



Figure III-4. The overlay total ion chromatograms (TICs) of compounds detected by DHS ATD-GC-MS analysis on aerial parts of *7713* fine lavender. The green and broken red lines respectively indicated a sample from asymptomatic and symptomatic profile. The numbers correspond to the compounds detailed in Table III-1.

Table III-1. Relative percentages of 7713 fine lavender and *abrial* lavandin VOCs trapped on asymptomatic and symptomatic plants in fields and identified by ATD-GC-MS.

				Area 7713 (%	± SD) ^[a]	Area abrial (% ± SD) ^[a]			
N°	LRI (calc.)	LRI (lit.)	Compound			Corrected			Corrected
				Level 1 (A)	Level 3 (S)	p-value	Level 1 (A)	Level 2+3 (S)	p-value
	Alcohols								
3	853	854	(<i>Z</i>)-3-hexen-1-ol	-	-	-	0.09 ± 0.12	0.02 ± 0.04	0.2300
6	984	980	1-octen-3-ol ^[b]	0.23 ± 0.2	0.08 ± 0.08	0.0212	0.4 ± 0.46	0.36 ± 0.28	0.6511
	Esters								
1	814	812	butyl acetate	0.25 ± 0.36	0.28 ± 0.17	0.1529	-	-	-
4	911	910	butyl propanoate	0.02 ± 0.03	-	0.0212	-	-	-
10	1007	1006	(Z)-3-hexen-1-ol acetate	0.63 ± 1.4	0.03 ± 0.08	0.0732	5.2 ± 5.17	1.42 ± 0.9	0.3893
13	1015	1014	hexyl acetate	0.85 ± 1.01	1.36 ± 0.73	0.0489	0.37 ± 0.35	0.44 ± 0.33	0.3180
23	1108	1108	hexyl propanoate	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.03	0.0701	-	-	-
24	1111	1112	1-octen-3-yl acetate	2.73 ± 1.55	1.3 ± 0.54	0.6398	0.51 ± 0.23	0.49 ± 0.18	0.3305
25	1113	1115	heptyl acetate	tr.	tr.	0.0212	-	-	-
26	1123	1124	3-octanol acetate	0.11 ± 0.16	-	0.0212	-	-	-
29	1149	1150	hexyl isobutanoate	0.05 ± 0.07	-	0.0212	0.09 ± 0.11	0.11 ± 0.08	0.5807
33	1193	1192	hexyl butanoate ^[b]	0.2 ± 0.3	0.31 ± 0.23	0.3564	0.11 ± 0.15	0.26 ± 0.35	0.6520
36	1285	1285	bornyl acetate	-	-	-	tr.	tr.	0.3180
37	1285	1291	lavandulyl acetate ^[b]	3.18 ± 1.99	4.22 ± 1.7	0.0212	0.8 ± 0.58	1.7 ± 1.37	0.2230
38	1358	1365	neryl acetate ^[b]	0.09 ± 0.11	0.06 ± 0.07	0.0212	-	-	-
41	1378	1376	geranyl acetate ^[b]	0.11 ± 0.21	-	0.0212	-	-	-
	Ketones								
7	985	985	3-octanone ^[b]	0.36 ± 0.36	0.21 ± 0.23	0.0212	0.34 ± 0.43	0.36 ± 0.22	0.3789

Chapitre III. COVs émis par les parties aériennes

	Monoterpen	e hydrocarbo	ons						
5	975	977	β -pinene	0.03 ± 0.04	0.05 ± 0.03	0.0212	-	0.02 ± 0.03	0.3180
8	987	972	β -myrcene ^[b]	2.02 ± 0.36	1.42 ± 0.13	0.3189	1.82 ± 0.42	1.89 ± 0.27	0.2300
9	999	1003	lpha-phellandrene ^[b]	0.22 ± 0.33	0.18 ± 0.14	0.0235	0.1 ± 0.06	0.09 ± 0.05	0.3180
11	1008	1012	lpha-terpinene	1.59 ± 1.51	0.09 ± 0.09	0.0243	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.2300
12	1014	1019	<i>p</i> -cymene ^[b]	0.01 ± 0.01	-	0.0212	0.37 ± 0.35	0.44 ± 0.33	0.2300
14	1016	1017	<i>o</i> -cymene	0.99 ± 0.9	0.27 ± 0.13	0.0426	0.35 ± 0.19	0.77 ± 0.99	0.4147
15	1018	1023	<i>m</i> -cymene	1.14 ± 0.83	0.59 ± 0.58	0.0969	1.72 ± 1.17	1.16 ± 0.9	0.4147
16	1022	1026	limonene ^[b]	1.14 ± 0.58	0.35 ± 0.09	0.0212	2.49 ± 1.7	1.37 ± 0.3	0.3180
18	1035	1040	(Z)-β-ocimene ^[b]	12.55 ± 7.98	11.25 ± 5.09	0.0235	6.33 ± 1.94	7.48 ± 1.66	0.2300
19	1045	1049	(<i>E</i>)-β-ocimene ^[b]	12.96 ± 5.75	8.99 ± 3.86	0.0212	6.99 ± 2.98	10 ± 1.55	0.0479
20	1052	1050	γ-terpinene ^[b]	0.17 ± 0.18	0.11 ± 0.08	0.0212	0.11 ± 0.07	0.07 ± 0.06	0.3180
21	1078	1078	terpinolene ^[b]	0.04 ± 0.05	-	0.0212	0.47 ± 0.31	0.57 ± 0.19	0.3180
27	1125	1128	allo-ocimene ^[b]	1.73 ± 0.73	1.41 ± 0.39	0.1529	0.93 ± 0.59	1.14 ± 0.42	0.3180
	Oxygenated	monoterpen	es						
17	1023	1030	1,8-cineole*	0.7 ± 1.47	-	0.0732	4.17 ± 5.04	1.33 ± 1.04	0.3180
22	1101	1099	linalool ^[b]	8.16 ± 5.91	5.4 ± 1.78	0.0490	18.89 ± 13	24.39 ± 18.42	0.7547
28	1136	1146	camphor ^[b]	0.03 ± 0.05	-	0.0212	6.23 ± 6.7	2.49 ± 1.4	0.3180
30	1163	1165	lavandulol ^[b]	0.08 ± 0.15	-	0.0212	-	-	-
31	1172	1172	terpinen-4-ol ^[b]	0.82 ± 0.6	0.59 ± 0.34	0.7105	0.08 ± 0.07	0.12 ± 0.09	0.6520
32	1189	1188	lpha-terpineol	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.04	0.0212	0.1 ± 0.09	0.07 ± 0.04	0.2561
35	1253	1256	linalyl acetate ^[b]	42.51 ± 17.03	55.84 ± 10.26	0.0212	32.15 ± 15.75	34.75 ± 14.58	0.3890
	Hydrocarbon	n sesquiterpe	nes						
39	1366	1358	daucene ^[b]	-	-	-	0.13 ± 0.08	0.14 ± 0.03	0.3180
40	1368	1374	lpha-bourbonene	-	-	-	0.01 ± 0.04	0.01 ± 0.03	0.3180
42	1401	1411	β-caryophyllene ^[b]	1.43 ± 0.33	1.22 ± 0.36	0.1077	1 ± 0.33	1.01 ± 0.29	0.5930
42 43	1401 1407	1411 1424	β -caryophyllene ^[b] α -santalene	1.43 ± 0.33 0.28 ± 0.17	1.22 ± 0.36 0.35 ± 0.13	0.1077 0.1006	1 ± 0.33 -	1.01 ± 0.29 -	0.5930 -

Chapitre III. COVs émis par les parties aériennes

	44	1422	1434	<i>trans</i> -α-bergamotene ^[b]	0.08 ± 0.07	0.13 ± 0.08	0.0249	0.49 ± 0.51	0.5 ± 0.48	0.3180	
	45	1435	1434	epi-β-santalene	-	-	-	0.07 ± 0.05	0.06 ± 0.06	0.3180	
	46	1437	1443	α-humulene ^[b]	0.08 ± 0.07	0.09 ± 0.05	0.0212	0.05 ± 0.04	0.07 ± 0.06	0.3347	
	47	1449	1453	(E)-β-farnesene ^[b]	1.73 ± 1.56	3.3 ± 2.36	0.0490	0.42 ± 0.64	0.76 ± 0.99	0.6520	
	48	1463	1482	germacrene D ^[b]	0.13 ± 0.14	0.21 ± 0.14	0.0643	0.49 ± 0.44	0.72 ± 0.62	0.3305	
	49	1482	1485	β -selinene ^[b]	-	-	-	0.03 ± 0.04	0.05 ± 0.05	0.3347	
	50	1497	1508	γ-cadinene	-	-	-	0.71 ± 0.74	0.44 ± 0.39	0.2300	
		Others									
	2	823	823	1-methoxyhexane	0.19 ± 0.26	0.09 ± 0.05	0.0212	0.11 ± 0.12	0.19 ± 0.06	0.8427	
	34	1218	1220	bornyl formate	-	-	-	0.23 ± 0.31	0.05 ± 0.07	0.2230	
				Alcohols	0.23 ± 0.2	0.08 ± 0.08	-	0.09 ± 0.12	0.02 ± 0.04	-	
Ester				Esters	8.22 ± 7.23	7.57 ± 3.55	-	7.07 ± 6.59	4.42 ± 3.20	-	
				Ketones	0.36 ± 0.36	0.21 ± 0.23	-	0.34 ± 0.43	0.36 ± 0.22	-	
				Monoterpene hydrocarbons	34.58 ± 19.24	24.7 ± 10.62	-	21.76 ± 9.81	25.08 ± 6.78	-	
				Oxygenated monoterpenes	52.32 ± 25.25	61.84 ± 12.43	-	61.62 ± 40.66	63.16 ± 35.57	-	
				Hydrocarbon sesquiterpenes	3.72 ± 2.34	5.3 ± 3.13	-	3.41 ± 2.92	3.76 ± 3	-	
				Total compounds	41	32	-	39	40	-	
	Corrected p-value obtained according to <i>multtest</i> function										
	LRI (c	alc.), linear re	tention inde>	calculated according to the ret	tention times of s	tandard n-alkane	e C6-C24 mixtu	ire			
	LRI (li	t.), linear rete	ntion index r	eported in the literature (NIST,	ESO)						

tr (trace compounds) refer to compound detected with relative percentages < 0.01%

- Absent

Corrected p-value obtained between asymptomatic and symptomatic plants have been added for every metabolite

A asymptomatic, S symptomatic, SD standard deviation

^[a] Area expressed as a percentage of the total GC area

^[b] detected by SPME on lavender flowers according to the literature [72, 120].

Despite the great amount of literature on lavender essential oil, only few studies address lavender emissions. Da Porto and Decorti (2008) have identified 55 compounds emitted by fine lavender after 1h of SPME extraction with a DVB-CAR-PDMS fiber [120]. In addition, An *et al.* (2001) an on-site field sampling of lavender fragrance using an aroma-trapping flask [72]. The main identified compounds were, as in the present study, linalool and linalyl acetate, although the relative proportions of individual compounds present slight differences due to the analysis of different cultivars from several environments. Storage stability could also have impact on quality and quantity of compounds trapped on Tenax. Previous works on breath sample demonstrated that sorbent tubes must be stored at low temperature, no more that 20 days, to avoid the total degradation of molecule [259, 260].

Even if samples were analysed 3 months after collection, our strategy provides results in accordance with the literature and allows, for the first time, to characterized VOCs released by lavandin under field conditions.

3.2 Multivariate analysis of VOCs emitted by symptomatic and asymptomatic *7713* fine lavender

To perform statistical analyses, the areas of each compound, obtained from GC-MS analyses was first normalized using the dry mass of aerial parts. All compounds with a relative area greater than 1% were grouped in a 14x25 matrix with the samples in rows and the detected compounds in columns (Annexe 8).



Figure III-5. Partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA) score plot of compounds emitted by 7713 fine lavender aerial part depending on plant levels of infection. (1), plants without symptoms (green); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red).

Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) is a supervised method whose aim is to optimize the inter-group variability. The performance of PLS-DA analysis models was first tested by cross-validation, repeated 10 times. To validate the PLS-DA, multiple repetitions are necessary to ensure a good estimate of the mean number of misclassifications (NMC), whose percentage must be low. Using a permutation test repeated 999 times, the p-value obtained by the MVA test is considered statistically significant when the P-value < 0.05.

As shown in Figure III-5, the PLS-DA score plot performed for 7713 lavender clearly differentiates asymptomatic (level 1, n=6) and symptomatic (level 3, n=8) groups with a small percentage of misclassification (10%) and significant difference between the levels (P-value < 0.05). Performance of the PLS-DA model by a ROC curve has been tested and validated: surface under the curve equal to 1.

The most discriminant metabolites (i.e., those with the highest VIP) are shown in Figure III-6 and Table III-2. These compounds were selected by setting the VIP score > 0.9. They include eight hydrocarbon monoterpenes, three oxygenated monoterpenes, two hydrocarbon sesquiterpenes, six esters and one ketone (Annexe 9).





Of all these discriminant compounds, some are preferentially emitted by asymptomatic plants, including linalool (**22**), limonene (**16**), (E)- β -ocimene (**19**), and terpinen-4-ol (**11**) (Figure III-6). Conversely, the emission of *(E)*- β -farnesene (**47**), lavandulyl acetate (**37**) or linalyl acetate (**35**) is preferentially associated with symptomatic plants of fine lavender (level 3). Eight of these compounds exhibit significant differences between the two levels of infection (Figure III-6).

Table III-2. VIP score of the top discriminant compounds in *7713* fine lavender plants. On the right, the result of the test of significance between asymptomatic (level 1) and symptomatic (level 3) plants (Mann & Whitney non-parametric test - *p < 0.05).

VIP score	Compound	<i>p</i> -value
1.542	(<i>E</i>)-β-farnesene	0.0490*
1.485	lavandulyl acetate	0.0212*
1.479	hexyl acetate	0.0489*
1.402	terpinen-4-ol	0.7105
1.39	linalyl acetate	0.0212*
1.036	linalool	0.0490*
1.031	3-octanol, acetate	0.0212*
0.967	allo-ocimene	0.1529
0.964	β -caryophyllene	0.1077
0.963	limonene	0.0212*
0.961	(Z)-β-ocimene	0.0235*
0.911	1,8-cineole	0.0732
0.909	β-myrcene	0.3189

3.3 Multivariate analysis of VOCs emitted by symptomatic and asymptomatic *abrial* lavandin

The area of each compound was normalized and grouped into a 20x36 matrix. Unlike fine lavender, three different infection levels were identified for *abrial* lavandin. In Figure III-7, PLS-DA score plots performed on *abrial* lavandin do not reveal significant differences between asymptomatic (level 1, n=10) and symptomatic plants (level 2, n=5; level 3, n=4) (Figure III-7B), nor between levels 1 to 3 (Figure III-7C), with a high percentage of misclassification (> 30%) and P-value > 0.05. Only the discriminant analysis carried out on levels 1 and 2 showed a significant separation and only a small percentage of misclassification (13.3%) with a P-value < 0.05 (Figure III-7D).



Figure III-7. PLS-DA score plots of compounds emitted by *abrial* lavandin aerial part depending on asymptomatic and symptomatic plants (A) or on plant levels of infection (B, C, D). (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red).

Table III-3. Identity and associated *p*-value of the significant metabolites that discriminate *abrial* lavandin plants depending on asymptomatic (level 1) to symptomatic (level 2) stages.

VIP score	Compound	<i>p</i> -value
1.546	(Z)-3-hexen-1-ol acetate	0.6841
1.513	lavandulyl acetate	0.5651
1.372	(E)-β-farnesene	0.9496
1.278	(<i>Z</i>)-β-ocimene	0.6841
1.249	hexyl acetate	0.7098
1.239	(<i>E</i>)-β-ocimene	0.5651
1.23	terpinolene	0.5651
1.227	allo-ocimene	0.7098
1.204	germacrene D	0.6012
1.092	β -pinene	0.7150
1.066	<i>trans</i> -α-bergamotene	0.6841
1.063	1,8-cineole	0.5651
1.035	linalool	0.9620
1.012	β -caryophyllene	0.7536

Performance of the PLS-DA model by a ROC curve has been tested and validated. Twentythree potential markers allowed separation between asymptomatic (level 1) and symptomatic (level 2) lavandin plants (Annexe 9). Fourteen compounds had a VIP score > 0.9 (Table III-3). Among them, (*Z*)-3-hexen-1-ol acetate (**10**), lavandulyl acetate (**37**), and (*E*)- β -farnesene (**47**) have been identified as the three most discriminant compounds.

For *abrial* variety lavandin, three levels of symptoms were represented, thus it was interesting to study the evolution of the relative abundances of these discriminant compounds according to the symptom level of the plant Apart for 1,8-cineole, stress due to the yellow decline disease causes an increase in emissions between level 1 and 2. Then, from a threshold of infection, the yellow decline disease causes a drying up of the plant which induces a negative effect on the emissions [139, 140, 261]. Even if no significant differences have been observed between the relative abundances for levels 2 and 3 and if more abundance variability have been observed with the increasing of disease severity, concentrations seem to decrease with the level of infection since plant emit fewer molecules when they die (Figure III-8B).

3.4 Could these metabolites be involved in the chemical interactions between lavender and their biotic and abiotic environment?

Currently, lavender fields in France show a steady decline due to the propagation of stolbur phytoplasma and other potential pathogens [19]. To better understand the interaction between phytoplasma, lavender and planthoppers, Yvin *et al.* (2018) have studied both emitted and stored VOCs of different lavender and lavandin varieties [34]. They determined that β -farnesene, β -caryophyllene, 1,8-cineole, myrcene, camphor, lavandulyl acetate and borneol could be considered as discriminant compounds to separate asymptomatic from symptomatic plants. In our study, twelve compounds, common to lavender *7713* and lavandin *abrial*, were identified as discriminant between floral bouquets of various infection levels. Five of these had already been identified as discriminant compounds in the study of Yvin *et al* [34]. Only three of them display the same emission trends in both studies: 1,8-cineole (**17**) a potential asymptomatic plant marker, and lavandulyl acetate (**37**) and (*E*)- β -farnesene (**47**) which are over-expressed in symptomatic plants.



Figure III-8. Changes in the relative abundance of the main discriminant compounds according to their VIP score (VIP score > 0.9) derived from PLS-DA on *abrial* lavandin aerial part and depending on plant levels of infection. (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red).

However, to determine if the change in emission between asymptomatic and symptomatic have an influence on H. obsoletus host plant searching, it is necessary to evaluate if the planthopper is able to detect the lavender VOCs. GC analyses coupled with Electroantennography Detection (EAD) were performed by Riolo et al. (2012) on H. obsoletus [32]. Planthopper males and females responded to eight and eleven compounds, respectively. Six volatile compounds were found to be present in both nettle and chaste tree headspace: methyl salicylate, (±)-linalool, (E)- β -caryophyllene, (E)- β -farnesene, (Z,E)- α -farnesene, (E,E)- α farnesene. Among others, 1,8-cineole from chaste tree elicited antenna responses in both males and females. Furthermore, (Z)-3-hexen-1-ol acetate elicited the antennal responses in females when released by nettle [32]. It should be noted that these compounds were also highlighted in this metabolomic study (Table III-2 and Table III-3). In the case of lavandin emissions, (Z)-3-hexen-1-ol acetate (10) and (E)- β -farnesene (47), the most important VIP score metabolites, along with lavandulyl acetate (37) and 1,8-cineole (17) allowed significant discrimination between asymptomatic (level 1) and symptomatic (level 2) plants. The release of (Z)-3-hexen-1-ol acetate (20) is known to be involved in defense strategies and/or resistance to parasites [262, 263], while (E)- β -farnesene is well known to mediate host recognition in several insect species and to be involved in defense mechanisms [264, 265]. Furthermore, Mayer et al. (2008) showed that phytoplasma (C. Phytoplasma mali) can manipulate the behavior of its vector insect by changing the odor blend of its host plant [247]. Compounds that have been identified in field conditions are likely to play a role in the behavior of this insect. Further studies are needed to investigate the perception of lavender volatiles by H. obsoletus using GC-EAD, and to determine if these metabolites can affect H. obsoletus behavior in nature, where VOC emissions are lower than those obtained under study conditions.

4 Conclusion

Using an efficient metabolomic approach we were able to extract VOCs in the field, identify compounds using ATD-GC-MS and to differentiate volatile compounds emitted by asymptomatic and symptomatic lavender plants. The PLS-DA score plot performed on 7713 fine lavender was validated due to the small percentage of misclassification (10%) and the P-value < 0.05, clearly differentiating asymptomatic and symptomatic plants. Eight compounds represent a significant difference in abundance between asymptomatic and symptomatic plants and seem to influence this repartition into two distinct groups: linalool, (*Z*)- β -ocimene, (*E*)- β -farnesene, lavandulyl acetate, hexyl acetate, 3-octanol acetate, and limonene.

The PLS-DA score plot performed on *abrial* lavandin from asymptomatic (level 1) and symptomatic (level 2) plants showed a significant separation into two groups, with a small percentage of misclassification (13.3%), and a P-value < 0.05. Among the compounds which differentiate the two groups, no difference in relative abundances was observed.

Only linalool and (*E*)- β -farnesene are known to be detected by *H. obsoletus*, which may indicate their implication as markers involved in lavender decline [32].

To confirm these results, a study including more lavender varieties and VOCs collecting over several years is needed. Furthermore, a multi-omic data-driven approach integrating metabolomics, transcriptomics and phenotypic/behavioral data is necessary to understand the complex relationships between host plant, pest, pathogen and environment involved in the yellow decline of lavender.

Author Contributions ES performed the experiments and analyzed the data. ES, FN, XF and TM wrote the article. FN, TC, XF and TM supervised the research work. All authors read and approved the article.

Acknowledgements The authors acknowledge all the partners involved in the EUCLIDE project (n° 154827) co-funded by SPLP Funds (http://www.sauvegarde-lavandes-provence.org/fr/) and SUD PACA region (France). Eric Chaisse is also thanked for its support, expertise and comments on the project.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare.

Research involving human or animal rights This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

III.2.2. Bilan de l'étude réalisée en 2017

Cet article décrit une approche métabolomique qui va de l'extraction des COVs de lavande et lavandin sur le terrain jusqu'à l'identification des marqueurs par ATD-GC-MS. Une variabilité chimique a été observée entre les COVs émis de lavande et lavandin asymptomatiques et symptomatiques. De plus, une différence de COVs en fonction du niveau d'infection des plants de lavandin a été démontrée pour la première fois. Des biomarqueurs potentiellement impliqués dans le dépérissement de la lavande ont été mis en évidence. Dans le cas du lavandin, l'acétate de (*Z*)-3-hexène-1-ol ainsi que le (*E*)- β -farnésène, molécules ayant des VIP score les plus élevés avec l'acétate de lavandulyle et le 1,8-cinéole, permettent une séparation significative entre les plantes asymptomatiques de niveau 1 et les plantes symptomatiques de niveau 3. Par conséquent, les composés mis en évidence par notre stratégie métabolomique pourraient être testés par des tests de choix sur les insectes pour voir leur potentielle implication dans les interactions chimiques entre lavande/cicadelle/phytoplasme.

Il est possible de départager les plants symptomatiques de ceux asymptomatiques en fonction des composés émis par les parties aériennes. Parmi les composés à l'origine de cette répartition, sept composés sont détectés par la cicadelle en GC-EAD [32, 266]. Pour le lavandin *abrial*, les plants symptomatiques présentent des émissions plus importantes d'acétate de linalyle, de linalol, d' α -bergamotène, de β -caryophyllène, de β -farnésène et de germacrène D. A l'opposé, les plants asymptomatiques se caractérisent par une plus forte émission en 1,8-cinéole. De plus, d'après des tests de choix réalisés dans le cadre du projet au sein du CRIEPPAM, le β -farnésène semble être une molécule attractive alors que le β -caryophyllène semble être répulsive à la cicadelle.

Des différences de comportements ont néanmoins été observés entre la lavande fine 7713 et le lavandin *abrial*. Pour confirmer ces résultats, une étude incluant davantage de variétés de lavande et de lavandin ainsi que le piégeage de COVs sur plusieurs années devrait être réalisée.

III.3. <u>Résultats de l'étude métabolomique 2018</u>

L'étude métabolomique décrite en III.2 a été réalisée une seconde fois en 2018. En plus des plants analysés en 2017, deux autres variétés ont également été étudiées en 2018. Les COVs émis par les lavandes fines 7713 et *maillette* ainsi que les lavandins *abrial* et *grosso* ont été étudiés dans le but de différencier des plants asymptomatiques de plants symptomatiques sur deux variétés supplémentaires. La caractérisation de potentielles différences d'émissions en COVs des parties aériennes entre des variétés sensibles (7713, *abrial*) et tolérantes (*maillette, grosso*) n'a pas été étudiée puisque seule une variété sensible ou tolérante est représentée au sein de chaque espèce.

En raison du disfonctionnement d'un débitmètre et pour gagner du temps lors des piégeages en champ, les paramètres d'extraction ont été modifiés :

- Temps d'extraction de 45 minutes au lieu de 60 en 2017 ;
- Flux d'air entrant et flux sortant respectivement diminués à 90 mL/min et 70 mL/min.

Les paramètres de thermodésorption ont également dû être modifiés en fonction de la faible abondance en composés piégés. Les composés volatils désorbés des tubes ont été transférés dans la colonne de GC avec des débits entrant et sortant fixés à 10 mL/min, soit 7,6 % d'échantillon injecté.

Ces paramètres ayant été modifiés entre les deux années d'étude, la variabilité chimique des COVs émis entre 2017 et 2018 n'est pas comparable. Les données ont donc été traitées séparément.

III.3.1. Caractérisation chimique des COV émis par différentes variétés de lavande fine et lavandin en 2018

Lors de la campagne d'échantillonnage réalisée en 2018, un total de 82 extractions, incluant les contrôles, ont été réalisées en utilisant le dispositif DHS présenté en III.1.2. Pour les variétés identiques aux études réalisées en 2017 (*abrial* et 7713), les mêmes plants ont été utilisés. Les abondances relatives des COVs émis par les quatre variétés sont détaillées au Tableau III-4.

Comparées aux composés identifiés en 2017, les mêmes familles chimiques incluant les esters, monoterpènes et sesquiterpènes ont été détectées dans les quatre variétés étudiées en 2018 (Tableau III-4). Au total, 45 composés différents ont pu être détectés suite aux piégeages sur les différents plants sélectionnés en champ dont 39 ont pu être identifiés. D'après les analyses en GC-MS, plus de COVs (en moyenne 30 composés) ont été détectés dans les variétés de lavandes comparées aux COVs des variétés de lavandins (en moyenne 20 composés détectés). Les six composés non identifiés représentent moins de 2 % de l'aire totale.

Les monoterpènes oxygénés sont globalement les composés majoritaires émis par toutes les variétés et l'acétate de linalyle a été identifié comme majoritairement émis par les variétés de lavandes alors que le camphre est majoritairement émis par les variétés de lavandins. Parmi les monoterpènes hydrocarbonés, en plus du (*Z*)- et (*E*)- β -ocimène présents dans les quatre variétés, le β -myrcène ainsi que l'allo-ocimène ont également été identifiés en 2018. Pour la variété *abrial*, les abondances relatives sont similaires à celles obtenues en 2017 (25 % de monoterpènes hydrocarbonées et 65 % de monoterpènes oxygénés) alors que des écarts d'environ 15 % sont observés entre les pourcentages relatifs de la variété *7713* entre 2017 et 2018. Les plantes symptomatiques, toutes variétés confondues, semblent émettre plus de monoterpènes oxygénés et moins de monoterpènes hydrocarbonés.

Tableau III-4. Pourcentages relatifs des COVs piégés en 2018, en champ, sur des lavandes et lavandins asymptomatiques (A) et symptomatiques (S) et identifiés par ATD-GC-MS.

IR	IR	Composé	Aire des pics 7713 (% ± SD) ^[a]		Aire des pics <i>maillette</i> (% ± SD) ^[a]		Aire des pics <i>abrial</i> (% ± SD) ^[a]		Aire des pics <i>grosso</i> (% ± SD) ^[a]	
(calc.)	(litt.)	Compose	(A)	(S)	(A)	(S)	(A)	(S)	(A)	(S)
811	812	acétate de butyle	0,07 ± 0,1	0,31 ± 0,31	0,14 ± 0,2	0,08 ± 0,1	0,12 ± 0,24	-	-	-
908	910	propanoate de butyle	0,17 ± 0,07	0,05 ± 0,05	-	-	-	-	-	-
940	942	camphène	0,08 ± 0,16	-	-	-	-	-	-	-
849	854	<i>(Z)</i> -3-hexène-1-ol	-	-	0,11 ± 0,16	0,17 ± 0,2	0,06 ± 0,15	0,02 ± 0,07	-	-
867	867	1-hexanol	-	-	$0,13 \pm 0,14$	0,13 ± 0,15	-	-	-	-
966	977	β-pinene	-	-	-	-	0,34 ± 0,24	0,08 ± 0,1	-	-
984	980	1-octen-3-ol ^[b]	-	0,03 ± 0,05	2,05 ± 0,85	1,43 ± 0,7	-	-	-	-
987	990	β-myrcène ^[b]	7,76 ± 2,54	8,59 ± 4,23	21,31 ± 12,97	13,9 ± 4,35	6,37 ± 1,95	5,42 ± 2,38	16,38 ± 12,09	10,55 ± 6,21
997	994	butanoate de butyle	-	0,04 ± 0,06	0,13 ± 0,16	0,07 ± 0,09	-	-	-	-
1001	1003	α -phellandrène ^[b]	0,03 ± 0,07	0,01 ± 0,02	-	0,04 ± 0,06	-	-	0,6 ± 0,5	1,29 ± 1,29
1006	1006	acétate de <i>(Z)</i> -3-hexen-1-ol ^[b]	2,44 ± 1,45	1,35 ± 1,26	3,12 ± 3,04	1,48 ± 1,27	1,31 ± 0,72	1,41 ± 1,21	-	-
1014	1019	p-cymène ^[b]	1,19 ± 1	1,7 ± 1,92	1,2 ± 1,01	0,7 ± 0,32	-	-	-	-
1015	1014	acétate d'hexyle	0,8 ± 0,57	1,06 ± 1,32	-	-	0,23 ± 0,19	0,18 ± 0,13	-	-
1016	1017	o-cymène	1,44 ± 1,06	1,31 ± 2,3	1,52 ± 0,79	1,94 ± 1,19	0,92 ± 0,46	1,63 ± 0,96	-	-
1019	1023	m-cymène	4,55 ± 3,14	5,98 ± 6,75	5,55 ± 2,65	7,45 ± 4,67	-	-	1,79 ± 0,78	2,14 ± 1,57
1024	1026	limonène ^[b]	4,95 ± 3,01	3,76 ± 2,61	1,52 ± 1,16	0,76 ± 0,45	4,11 ± 4,33	1,88 ± 1,09	4,28 ± 1,46	4,62 ± 3,89
1026	1030	1,8-cinéole	3,56 ± 2,4	0,91 ± 0,66	0,05 ± 0,12	0,05 ± 0,12	12,07 ± 8,91	7,81 ± 4,15	11,79 ± 5,88	10,36 ± 5,77
1035	1040	<i>(Ζ)</i> -β-ocimène ^[b]	3,39 ± 1,42	2,82 ± 1,72	1,14 ± 0,55	0,55 ± 0,3	1,89 ± 0,57	1,32 ± 0,71	1,1 ± 0,62	0,65 ± 0,55
1045	1049	<i>(E)</i> -β-ocimène ^[b]	15,99 ± 4,47	10,81 ± 4,04	6,55 ± 6,06	2,79 ± 0,76	8,25 ± 2,33	6,03 ± 3,07	5,61 ± 2,16	3,67 ± 2,2
1053	1050	γ-terpinène ^[b]	0,18 ± 0,08	0,06 ± 0,06	-	-	-	-	-	-
1080	1078	terpinolène ^[b]	0,03 ± 0,09	0,01 ± 0,02	-	-	0,49 ± 0,23	0,3 ± 0,21	-	-
1099	1099	linalol ^[b]	8,95 ± 3,3	10,07 ± 3,14	19,91 ± 4,1	19,27 ± 3,76	8,94 ± 2,72	12,17 ± 5,27	15,61 ± 4,83	12,78 ± 8,02
1109	1108	propanoate d'hexyle	1,38 ± 0,67	1,37 ± 0,8	0,32 ± 0,3	$0,2 \pm 0,14$	0,12 ± 0,28	0,03 ± 0,1	-	-
1121	1124	acétate de 3-octanol	-	-	0,06 ± 0,17	0,02 ± 0,04	-	-	-	-
1126	1128	allo-ocimène ^[b]	13,26 ± 9,17	6,25 ± 2,29	2,99 ± 1,98	1,48 ± 0,77	6,7 ± 2,71	4,65 ± 3,08	3,31 ± 1,11	2,23 ± 1,34

1138	1146	camphre ^[b]	0,36 ± 0,22	0,3 ± 0,34	1,32 ± 1,1	2,91 ± 2,23	33,6 ± 18,19	38,96 ± 28,13	24,73 ± 10,64	38,93 ± 15,06
1164	1166	bornéol	-	-	1,52 ± 1,45	3,16 ± 2,01	0,7 ± 0,55	1,93 ± 1,67	0,65 ± 0,47	2,76 ± 2,35
1174	1172	terpinène-4-ol ^[b]	0,27 ± 0,19	0,51 ± 0,22	-	-	-	-	0,72 ± 0,68	0,76 ± 0,72
1191	1188	lpha-terpinéol ^[b]	0,01 ± 0,03	0,06 ± 0,07	0,18 ± 0,21	0,1 ± 0,12	-	-	-	-
1221	1217	γ-terpinéol	-	-	-	0,05 ± 0,08	-	-	-	-
1253	1256	acétate de linalyle ^[b]	23,73 ± 9,51	35,46 ± 19,28	25,7 ± 19,74	36,21 ± 22,86	9,01 ± 6,71	10,67 ± 7,33	9,53 ± 5,36	7,53 ± 7
1280	1285	acétate de bornyle	0,03 ± 0,1	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,04	0,02 ± 0,05	-	-	-	-
1285	1291	acétate de lavandulyle ^[b]	1,65 ± 1,17	3,09 ± 2,1	-	-	1,14 ± 1,99	1,42 ± 1,7	0,96 ± 1,02	1,07 ± 1,1
1373	1374	lpha-bourbonène	-	-	-	-	0,02 ± 0,06	0,05 ± 0,14	-	-
1381	1405	<i>cis</i> - α -bergamotène ^[b]	0,03 ± 0,06	0,25 ± 0,27	0,14 ± 0,17	0,4 ± 0,54	-	-	-	-
1409	1411	β-caryophyllène ^[b]	1,48 ± 0,62	1,29 ± 0,44	1,12 ± 0,47	1,42 ± 0,27	2,28 ± 1,51	2,35 ± 1,25	0,27 ± 0,61	0,22 ± 0,49
1425	1434	<i>trans</i> -α-bergamotène ^[b]	-	-	-	-	0,19 ± 0,23	0,23 ± 0,23	-	-
1451	1453	<i>(E)</i> -β-farnésène ^[b]	0,5 ± 0,24	1,06 ± 0,71	0,44 ± 0,48	0,9 ± 0,56	0,24 ± 0,35	0,35 ± 0,4	-	-
		Alcools	-	0,03 ± 0,05	2,29 ± 1,15	1,73 ± 1,05	0,06 ± 0,15	0,02 ± 0,07	-	-
		Esters	6,54 ± 4,14	7,26 ± 5,93	3,79 ± 3,91	1,87 ± 1,68	2,93 ± 3,43	3,04 ± 3,14	0,96 ± 1,02	1,07 ± 1,1
		Monoterpènes hydrocarbonés	52,84 ± 26,22	41,3 ± 25,97	41,77 ± 27,19	29,62 ± 12,88	29,08 ± 12,82	21,32 ± 11,6	33,08 ± 18,71	25,13 ± 17,05
		Monoterpènes oxygénés	36,88 ± 15,65	47,3 ± 23,72	48,68 ± 26,72	61,74 ± 31,17	64,32 ± 37,07	71,55 ± 46,55	63,05 ± 27,86	73,13 ± 38,92
		Sesquiterpènes hydrocarbonés	2,01 ± 0,92	2,59 ± 1,42	1,7 ± 1,12	2,72 ± 1,37	2,73 ± 2,15	2,97 ± 2,01	0,27 ± 0,61	0,22 ± 0,49

^[a]Aire exprimée en pourcentage de la superficie totale.

^[b]identifié dans la littérature (détection par SPME sur des lavandes en fleurs) [72].

(A), asymptomatique. (S), symptomatique.

IR (calc.), indice de rétention calculé d'après les temps de rétention d'un mélange de n-alcanes (C₆-C₂₄).

IR (litt.), indice de rétention reporté dans la littérature (NIST, ESO).

SD, déviation standard.

-, absent.

III.3.2. Différences de signatures chimiques entre plants asymptomatiques et symptomatiques de quatre variétés en 2018

Des analyses statistiques ont été réalisées sur les émissions des quatre variétés selon le même protocole utilisé pour traiter les données de 2017 (III.2). Des ACP exécutées sur chaque variété ont permis de supprimer les individus et/ou variables non influant au modèle. Plus la couleur tend vers le rouge, plus l'individu ou la variable contribue au modèle.





Figure III-9. Graphique des individus (A) et des variables (B) des composés émis par les parties aériennes de la lavande fine *maillette* en 2018 suivant leur contribution au modèle.

Les ACP réalisées sur la lavande *maillette*, montrent que les individus 5, 6, 7 et 9 (A) ainsi que les variables en bleu (temps de rétention de 50,2417 et 50,299 min) (B) contribuent les moins au modèle (Figure III-9). Ces données ont donc été enlevées de la matrice initiale et le nouveau jeu de données a été utilisé pour les analyses discriminantes. Or, les analyses discriminantes n'ont pas montré de différences significatives entre les échantillons asymptomatiques et ceux symptomatiques sur la lavande *maillette* (Figure III-10A). De même, aucune différence significative n'a été observée sur la variété *7713* en 2018 (Figure III-10B).



Figure III-10. PLS-DA sur les composés émis par les variétés *maillette* (A), 7713 (B), *abrial* (C) et *grosso* (D) suivant les niveaux d'infection. (1), plantes sans symptômes (vertes), (2), plantes légèrement jaunissantes, avec moins de hampes florales (orange), (3), plantes n'ayant presque pas de tiges florales, mais avec quelques feuilles (rouges).

III.3.2.2. Étude sur les lavandins

Les analyses discriminantes réalisées sur les COVs piégés sur les variétés de lavandins n'ont également pas pu être validées statistiquement en 2018 : P-valeurs élevées (P >> 0,05) et pourcentages d'erreurs de classification important (NMC > 50 %) (Figure III-10). Aucune différence distincte n'a pu être observée que ce soit entre les niveaux d'infection 1 et 3 des plants d'*abrial* (B) ou entre les niveaux 1 et 2 de la variété *grosso* (D).

III.3.2.3. Hypothèses des répartitions non distinctes entre les plants asymptomatiques et symptomatiques

La non-validation peut provenir des modifications des conditions d'extraction et/ou d'analyse réalisés en 2018. Même si le nombre total de composés détectés est similaire entre les deux années (50 composés détectés en 2017 face à 45 en 2018, toutes variétés confondues), l'abondance totale des composés détectés était beaucoup plus faible en 2018 (4,5 x 10^7) qu'en 2017 (6,1 x 10^8). De plus, la variabilité annuelle peut également jouer sur la répartition des COVs.

Étant donné l'implication et la modification de plusieurs paramètres, il est difficile d'établir pourquoi les résultats obtenus en 2018 ne sont pas semblables à ceux obtenus en 2017. Pour

déterminer les paramètres d'extraction et d'analyse optimaux, diverses conditions devraient être testées et optimisées au préalable. Ces tests peuvent être faits sur plants en fleurs sous serre dans un premier temps, même si les conditions ne seront pas identiques à celles sur le terrain. De la même façon que le plan d'expérience prévisionnel prévu pour déterminer les paramètres optimaux des extractions DHS sur les racines et décrit dans le Tableau II-7, les paramètres (facteur (niveau)) suivants peuvent être testés en 16 expériences : heure d'extraction (de 10 h à 16 h), durée d'extraction (de 30 à 120 min), les débits entrant et sortant (de 50 à 200 mL/min) ainsi que le type d'adsorbant employé tels que Porapak Q, Tenax TA, Carbotrap ou encore Carboxen. Une fois les paramètres optimaux déterminés, les extractions sur le terrain ou en serre sur plusieurs variétés sont à réaliser en impliquant plusieurs réplicats biologiques.

III.3.3. Évolution des variabilités chimiques entre 2017 et 2018

Même si les plants asymptomatiques et symptomatiques de toutes les variétés n'ont pas pu être départagés en deux groupes significativement distincts sur l'année 2018, nous avons tout de même cherché à voir s'il existait des différences d'abondances relatives entre les plants asymptomatiques et symptomatiques pour les composés discriminants identifiés en 2017 (Figure III-6 et Figure III-8).

III.3.3.1. Lavande fine 7713

De tous les composés discriminants identifiés en 2017 sur la variété 7713, seul l'acétate de 3octanol n'a pas été identifié parmi les COVs émis sur cette même variété en 2018. Certains composés présentent des tendances similaires aux émissions 2017 : le limonène ou le (*Z*)- β ocimène semblent également être des marqueurs asymptomatiques (Figure III-11A), alors que le (*E*)- β -farnésène ainsi que l'acétate de lavandulyle sont des potentiels marqueurs de plants symptomatiques. Ce ne sont que des tendances puisqu'aucun de ces composés n'ont donné de différences significatives entre les abondances relatives.

III.3.3.2. Lavandin *abrial*

De même que pour la variété 7713, les plants asymptomatiques (niveau 1) et symptomatiques (niveau 3) n'ont pas pu être départagés en deux groupes significativement distincts sur l'année 2018. De plus, les plants notés de niveau 2 en 2017 sont passés au niveau d'infection 3, ce qui fait qu'uniquement deux niveaux d'infection sont représentés en 2018 sur la variété *abrial*. Sur les composés discriminants mis en évidence en 2017, l'acétate de lavandulyle ainsi que le (*E*)- β -farnésène semblent à nouveau plus émis par les plants symptomatiques mais sans différences significatives (Figure III-11B). On peut noter également que deux composés (germacrène D et β -pinène) n'ont pas été identifiés en 2018.



Figure III-11. Abondances relatives de composés discriminants émis en 2018 par les parties aériennes de lavande fine *7713* (A) ou de lavandin *abrial* (B) en fonction des niveaux d'infection des plantes. (1), plantes sans symptômes (vertes) ; (3), plantes n'ayant presque pas de tiges florales, mais avec quelques feuilles (rouges).

III.3.3.3. Bilan

Finalement, les résultats obtenus en 2017 n'ont pas pu être confirmés suite aux études réalisées en 2018 incluant davantage de variétés de lavande et de lavandin. Cependant, des tendances d'émissions similaires ont pu être mises en évidence sur les deux années.

La « non validation » des modèles peut être due à l'évolution des symptômes entre 2017 et 2018. En effet, certains plants de niveau 3 en 2017 sont passés au niveau 4 (morts) et plusieurs notés de niveau 2 sont devenus plus infectés (niveau 3). C'est le cas pour le lavandin *abrial* qui ne présentait plus que des plants de niveau 3 en 2018.

III.3.4. Modification du bouquet de COVs en fonction de l'infection des plantes par le phytoplasme

La détection et la caractérisation des phytoplasmes infectant les plantes sont faites à l'aide de méthodes de biologie moléculaire basées sur l'étude des ARN [20]. Des prélèvements de parties végétatives ont été réalisés par le CRIEPPAM en 2018 sur les plants étiquetés en automne, période qui semble plus favorable à la détection du phytoplasme que le printemps. D'après Sémétey *et al.* (2018), sur 1970 plants testés entre 2008 et 2010, la détection du phytoplasme était significativement plus importante en automne comparée aux prélèvements réalisés au printemps [19].

Suite aux qPCR réalisées sur les lavandes 7713 supposées infectées (6 en 2017 et 7 en 2018), seules deux présentaient réellement le phytoplasme. Concernant les lavandins *abrial*, sur 10 plants analysés en 2017, seuls trois étaient porteurs du phytoplasme alors que sur les 9 plants symptomatiques analysés en 2018, 5 ont donné une réponse d'infection positive. Ces faibles réponses positives peuvent être dues à la fluctuation des populations de phytoplasmes au cours de l'année. De plus, les phytoplasmes sont significativement mieux détectés dans les plants de lavande fine que dans les plants de lavandin. La raison de ces variations est cependant mal comprise et les méthodes de détection ne sont pas forcément optimisées [19].

Les analyses discriminantes réalisées sur les lavandins *abrial* en 2017 et 2018 sont toutefois représentées en Figure III-12. Il n'est cependant pas possible de différencier des plantes saines (H: healthy) de plantes infectées (I: Infected) pour la variété de lavandin *abrial* : pourcentages d'erreurs de classification élevés (25,6 % en 2017 et 58,1 % en 2018) et différence non significative entre les groupes (valeur P > 0,05).

D'après les abondances relatives de certains composés émis par le lavandin que ce soit en 2017 (Figure III-12B) et 2018 (Figure III-12D), l'acétate de lavandulyle et le (*E*)- β -farnésène semblent plus abondant dans les plants infectés ce qui appuie la tendance observée sur les différences entre plants asymptomatiques et symptomatiques. Cependant, ce ne sont que des hypothèses, les différences n'ont pas donné de résultats significatifs.



Figure III-12. PLS-DA sur les composés émis par le lavandin *abrial* suivant les états sains (noir)/infectés (rouge) des plants en 2017 (A) et 2018 (C) et abondances relatives de certains composés émis en 2017 (B) et 2018 (D) en fonction des états sains (vert)/infectés (rouge).

III.4. Conclusions et perspectives

Réaliser des expériences sur le terrain est un challenge mais permet d'avoir une meilleure estimation de ce que les plantes émettent en conditions naturelles et des composés qui peuvent être perçus par l'insecte dans son environnement. Dans le cadre du dépérissement de la lavande, l'objectif est de mieux comprendre les interactions chimiques impliquées entre lavande et cicadelle. Pour cela, l'étude des COVs émis par des plantes asymptomatiques et symptomatiques a pour but de mettre en évidence des marqueurs chimiques pouvant servir de répulsif ou attractif à l'insecte vecteur de la bactérie pathogène.

Des marqueurs ont été mis en avant dans le cadre du programme ECHoStol (études en laboratoire et en champ) [34]. Ce programme avait pour but d'étudier les facteurs sensoriels dans le choix de plantes et dans le comportement alimentaire des adultes *H. obsoletus* afin d'améliorer la lutte contre le phytoplasme du stolbur dans les cultures de lavande/lavandin, vigne et tabac. Dans le cas de la lavande, ils ont révélé que le β -farnésène, le β -caryophyllène, le 1,8-cinéole, le myrcène, le camphre, l'acétate de lavandulyle et le bornéol pourraient être considérés comme composés discriminants séparant les plantes asymptomatiques des plantes symptomatiques.

Dans notre étude, une répartition des échantillons en deux groupes distincts asymptomatique/symptomatique a pu être mise en évidence en 2017, contrairement aux études réalisées en 2018. Des biomarqueurs mis en évidence en 2017 semblent participer à la séparation des émissions suivant les niveaux d'infection que ce soit sur les émissions de la variété de lavande 7713 (13 composés discriminants identifiés) et du lavandin *abrial* (14 composés). Cinq de ces marqueurs ont déjà été identifiés comme des composés discriminants lors du programme précédent (ECHoStol) dont trois d'entre eux ont les mêmes tendances d'émission : le 1,8-cinéole semble être un marqueur de plant asymptomatique, alors que l'acétate de lavandulyle et le (*E*)- β -farnésène ont été sur-exprimés par les plantes symptomatiques. Ces tendances ont été retrouvées lors des études réalisées en 2018 (Figure III-11) et également en comparant les plants sains de ceux infectés au phytoplasme (Figure III-12). Ainsi les composés sur-exprimés par les plantes symptomatiques peuvent être des signaux de défense de la plante face à l'attaque de la cicadelle.

Cependant, pour déterminer l'influence réelle de ces composés sur *H. obsoletus*, il est nécessaire de vérifier si ce dernier peut percevoir les COVs émis par la lavande. D'après les études de Riolo *et al.* (2012) réalisées sur orties et gattiliers, 1,8-cinéole, acétate de lavandulyle et (*E*)- β -farnésène ont suscité des réponses antennaires sur l'insecte [32].

Il est possible de détecter des différences de signature chimique en fonction de l'état asymptomatique *vs.* symptomatique d'un plant de lavande ou lavandin par l'étude des COVs émis. D'après nos résultats, l'acétate de lavandulyle et le (*E*)- β -farnésène semblent être des marqueurs de plants infectés puisqu'ils semblent plus émis par les plants de lavandin *abrial* symptomatiques et indiqués positifs après qPCR en 2017. D'autre part, le 1,8-cinéole semble plus émis par les plants asymptomatiques que ce soit par le lavandin *abrial* en 2017 et par la lavande fine *7713* en 2018. Ce composé est un potentiel marqueur de plants sains. Il serait intéressant de réaliser de nouveaux piégeages sur le terrain, en reprenant les mêmes paramètres que ceux utilisés lors des échantillonnages de 2017.

Ainsi, par cette stratégie métabolomique effectuée en plein champ sur les COVs de parties aériennes de différentes variétés de lavande et lavandin, des composés sont suggérés comme potentiels marqueurs chimiques impliqués dans les relations lavande/insecte/bactérie. D'autres études sont en cours pour étudier la perception des COVs de lavande par *H. obsoletus* (analyses en GC-EAD) et déterminer si ces métabolites affectent le comportement de l'insecte dans son environnement. Une fois qu'un composé ou un mélange de composés a pu être identifié en laboratoire comme étant attractif (ou répulsif) pour l'insecte, il est évalué par des tests comportementaux réalisés dans des cages pour étudier le comportement des insectes en conditions extérieures. Des tests de choix sur les composés identifiés comme marqueurs sont réalisés au CRIEPPAM. Les résultats actuels des tests obtenus sur deux molécules sont encourageants pour le développement de pièges en champ. Pour vérifier l'efficacité des molécules sur le terrain, le nombre de pièges nécessaires par hectare ainsi que l'attraction d'espèces non-cibles sont à prévoir.

Chapitre IV.

Étude métabolomique sur les COVs stockés par les feuilles et inflorescences de lavande et lavandin

Chapitre basé sur la publication :

STIERLIN É., NICOLÈ F., COSTES T., FERNANDEZ X., MICHEL T. Optimisation and application of a metabolomic workflow to characterize stored volatiles compounds involved in the lavender yellow decline disease. *In progress.*



IV.1. Contexte et design expérimental

IV.1.1. Lieux de stockage des COVs

On parle de COVs émis pour les COVs libérés dans l'atmosphère à un temps t et de COVs stockés pour ceux non libérés, mais présents dans les structures de stockage des plantes.

Tous les compartiments cellulaires semblent participer à la biosynthèse des COVs mais leur stockage est réalisé dans des structures spécialisées : glandes, poches, canaux ou autres organes [166].

Chez les Lamiaceae, les COVs sont stockés dans des structures généralement glandulaires à la surface des fleurs et feuilles [74]. Il existe deux types de structures dans cette famille : les trichomes peltés et les trichomes capités [67]. Ces trichomes sont composés de cellules épidermiques basales donnant par division une ou plusieurs cellule(s) de pied elles-mêmes surmontées d'une à plusieurs cellules sécrétrices. Chez *L. angustifolia*, les trichomes peltés comptent huit cellules de tête (Figure IV-1) alors que les trichomes capités ne comptent qu'une à deux cellules. Les COVs sont accumulés sous la cuticule des cellules sécrétrices et sont libérés de ces structures par diffusion passive en continue mais également émis en réponse aux attaques d'herbivores ou carnivores ou encore lors d'une distillation (Figure IV-1) [267]. Dans le cas de la lavande fine, le calice contiendrait 50 fois plus de composés volatils que dans la corolle [116].



Après hydrodistillation



IV.1.2. Problématique

Le phytoplasme du stolbur (*C*. Phytoplasma solani), bactérie pathogène affectant les cultures de lavandes, infecte les plantes en se développant au sein du phloème (section I.2.1.3). Sa présence bloque la circulation de la sève élaborée, solution contenant des substances organiques riches en glucides qui alimente les plantes [22]. Cette infection bactérienne provoque des symptômes phénotypiques caractéristiques du dépérissement de la lavande tels que le jaunissement et la réduction des inflorescences allant jusqu'à la mort prématurée du plant (Tableau I-3). Ces symptômes visuels laissent supposer que le phytoplasme modifie la composition chimique des plantes infectées telle que la synthèse et le transport des glucides [16, 20], ce qui peut induire des différences de COVs stockés.

Dans ce chapitre, des échantillons de lavande 7713 et lavandin *abrial* récoltés en 2017 ont été étudiés dans le but de comparer les compositions chimiques en fonction de l'état symptomatique des plants. Pour cela, une méthode permettant d'extraire et de caractériser les COVs stockés dans les inflorescences collectées sur le terrain, après les piégeages des COVs émis, a été mise en place.

Ainsi, les principaux objectifs de ce chapitre sont les suivants :

- (i) Optimiser un protocole d'extraction et d'analyse pour étudier les COVs stockés dans les feuilles et les inflorescences de lavande et lavandin (V.2)
- (ii) Mettre en avant les effets du dépérissement de la lavande sur la composition en COVs stockés et identifier des marqueurs chimiques de plants symptomatiques (V.2)
- (iii) Etudier les différences de compositions chimiques entre des plants sains et infectés
 (V.3)

Le développement d'une approche métabolomique sur une matière végétale donnée fait intervenir l'optimisation de plusieurs étapes : préparation de l'échantillon, analyse des COVs stockés et traitement des données. Dans notre étude, l'objectif est de mesurer l'impact du dépérissement sur les COVs stockés. Les étapes de ce design expérimental sont détaillées cidessous.

IV.1.3. Echantillonnage

La collecte des échantillons consiste à prélever les parties aériennes des mêmes plantes utilisées pour l'analyse des composés volatils émis, de manière contrôlée (port de gant, stérilisation des ciseaux) afin d'éviter les contaminations. Les échantillons ont été placés dans du papier aluminium puis plongés dans de l'azote liquide pour arrêter les réactions enzymatiques pouvant avoir lieu après l'échantillonnage. Cela permet au métabolome extrait d'être représentatif du métabolisme de la cellule au moment de l'extraction [100]. Pour le stockage et le transport avant les études en laboratoire, les échantillons ont été placés dans de la carboglace.

IV.1.4. Préparation de l'échantillon

La préparation des échantillons regroupe plusieurs étapes : séchage et broyage des échantillons ainsi que l'extraction des COVs. Ces étapes nécessitent d'être contrôlées puisque le métabolisme des plantes peut être modifié suite à des changements environnementaux qui conduisent à un stress cellulaire [268]. L'objectif est de pouvoir extraire et comparer des véritables signatures chimiques de COVs stockés issus de plants asymptomatiques et symptomatiques et non celles pouvant être induites lors de la préparation d'échantillon.

IV.1.4.1. Séchage

Le séchage du matériel végétal est souvent nécessaire dans le cadre d'une étude métabolomique [269]. La méthode de lyophilisation est principalement employée pour déshydrater les échantillons congelés à basse température et sous vide en évitant ainsi les dégradations dues à de hautes températures.

IV.1.4.2. Broyage

Un broyeur à billes a été utilisé pour obtenir une poudre homogène en quelques secondes à partir d'échantillon sec (Figure IV-2). Son principe repose sur le broyage rapide de petites quantités d'échantillons par chocs et frottements. Les bols contenant la matière végétale réalisent des mouvements oscillatoires sur le plan horizontal. Le broyage est obtenu par des billes présentent à l'intérieur des bols et qui vont frapper avec une forte énergie l'échantillon réparti sur les parois extérieures arrondies. Par l'utilisation de ce broyeur, l'objectif est d'obtenir un broyage fin et homogène de la matière végétale et extraire un maximum de composés [270].



Figure IV-2. Photo du broyeur MM 301 (Retsch GmbH & Co, Haan, Allemagne)

Lors d'une extraction assistée aux ultrasons, plus la taille des particules est faible, plus le nombre de cellules exposées au solvant augmente et donc plus ces cellules sont exposées au phénomène de cavitation induit par les ultrasons (phénomène décrit en section IV.1.4.3).

IV.1.4.3. Extraction solide-liquide assistée aux ultrasons

• Principe

L'extraction assistée aux ultrasons utilise des ondes sonores de fréquence supérieure à 20 kHz. La vibration se propage dans le milieu (liquide par exemple) en transférant l'énergie mécanique aux particules voisines. Les ultrasons se propagent dans le milieu liquide et provoquent la formation de bulles de cavitation (bulles de gaz) [271]. Le phénomène de cavitation créé par de rapides variations de pression, succession de compressions et de décompressions, entraine l'éclatement de bulles de cavitation en raison de fortes modifications de température et de pression à l'intérieur des bulles (Figure IV-3) [270].



Figure IV-3. Phénomène de cavitation (d'après [272])

Par ces effets, l'extraction des composés présents dans les cellules végétales est facilitée en augmentant la surface de contact entre la matière végétale et le solvant et apporte une amélioration de rendements dans certains cas [273–275]. Cette méthode est considérée comme facile d'utilisation, efficace, peu coûteuse, apportant de bons rendements et sans nécessiter une grande quantité de matière végétale [276, 277].

• Applications à la lavande

Deux études font références à l'utilisation de l'extraction assistée aux ultrasons pour caractériser des composés de lavande. Dans les deux cas, un mélange éthanol-eau a été utilisé pour extraire les composés de fleurs de lavande par extraction assistée aux ultrasons.

Dans un premier cas, après 5 min d'extraction, l'extrait a été séparé du résidu de matière végétale par filtration et concentré sous évaporation à vide à l'aide d'un évaporateur rotatif [119]. Par la suite les COVs ont été extraits avec trois fois 5 mL d'*n*-hexane (extractions

liquide/liquide), concentrés sous flux d'azote et analysés en GC-MS. Les extraits des fleurs de lavande fine étaient principalement composés de monoterpènes oxygénés (plus de 80 % en aire moyenne) incluant les composés majoritaires, linalol et acétate de linalyle.

Dans la seconde étude, l'extrait a été soumis aux ultrasons pendant 20 min, puis centrifugé pendant 4 min à 6000 rpm [278]. 1 mL du surnageant a été prélevé et ajouté à un mélange de 150 μ L de méthanol contenant 40 μ L de tétrachlorure de carbone, puis re-soumis aux ultrasons pendant 1 min pour homogénéiser la solution. Après centrifugation (1 min à 4000 rpm), le surnageant a été injecté en GC-MS. L'acétate de linalyle et le linalol étaient les deux composés principaux présents dans les extraits des trois variétés de lavande étudiées (« *French blue* », « *H-702* » et « *Xinxun-4* »).

L'extraction assistée aux ultrasons a été choisi préférentiellement à la méthode d'extraction par solvant accélérée (ASE) qui nécessite une grande quantité de matière, et à l'extraction assistée par micro-ondes qui peut induire des dégradations des composés [138]. Dans notre étude, les COVs stockés dans les feuilles et inflorescences de lavande et de lavandin ont été extraits par extraction assistée aux ultrasons. L'échantillon broyé est mélangé avec le *n*hexane dans un contenant et placé dans un bain à ultrasons pendant une durée déterminée et à température ambiante pour extraire également les composés thermosensibles.

IV.1.5. Séparation chromatographique

Dans le but de détecter un maximum de composé la méthode chromatographique a été, dans un premier temps, optimisée. Pour séparer les composés, l'utilisation de deux colonnes a été comparée : une colonne apolaire (Agilent, HP-1, 50 m x 0,2 mm x 0,33 µm) utilisée en routine au laboratoire et une colonne haute température (Agilent, DH-5HT, 30 m x 0,25 mm x 0,10 µm). La colonne haute température (gamme de 60°C à 400°C) a été testée dans le but d'éviter les problèmes de « bleeding » souvent observés en fin d'analyse et également de tenter de détecter plus de composés en augmentant la température (gradient : 60-100°C (2°C/min), 100-300 (8°C/min)-30 min). Même si le fait d'augmenter la température apporte un nettoyage de la colonne et évite la rétention de molécules moins volatiles dans la phase stationnaire, il a été observé qu'à partir d'environ 200°C, aucun composé n'a été détecté sur les profils chromatographiques obtenus avec la colonne haute température. De plus, une perte de composés très volatils tels que le 1,8-cinéole a été observée lorsque les analyses étaient réalisées avec une colonne haute température (Figure IV-4). La colonne apolaire habituellement utilisée a donc été choisie pour réaliser l'étude métabolomique, en employant un gradient de température qui monte de 40 à 220°C (2°C/min).



Figure IV-4. Chromatogrammes des composés détectés par GC-MS, séparation sur colonne DB-5HT (A) et HP-1 (B) dans des extraits hexaniques de feuilles de lavandin *grosso*.

Par la suite, quatre séries établies en fonction des groupes d'échantillons (7713 inflorescences, 7713 feuilles, abrial inflorescences et abrial feuilles) et réparties en trois séquences analytiques ont été programmées (Figure IV-5). L'ensemble représente 240 extraits à traiter, soit environ 512h d'analyses. Afin de contrôler les variabilités analytiques pouvant intervenir au cours des analyses, chaque série a été réalisée suivant un même ordre d'injection. Il a été choisi de répartir de manière aléatoire les échantillons dans la séquence analytique (randomisation des échantillons). Des blancs contenant du *n*-hexane distillé ont été injectés dans le but de contrôler la séquence et d'éliminer les contaminants présents dans le système analytique. De plus, des pools, correspondant à un mélange équivolumique de tous les échantillons de chaque série, ont été injectés au début de chaque série pour tester la répétabilité, puis tous les 9 échantillons pour évaluer un possible biais analytique ou des éventuelles variations.



85 analyses, 128 h pour 60 échantillons

Figure IV-5. Exemple d'une série d'analyses (inflorescences ou feuilles séparées d'une variété) répartie en trois séquences.

IV.1.6. Traitement des données

Les étapes précédentes optimisées, le traitement des données des nombreux échantillons a été réalisé selon les étapes de pré-traitement et analyses statistiques décrites dans la section I.8 ainsi que d'après les scripts détaillés en Annexe 17 et Annexe 18. Par ACP, les pools ont notamment servi à visualiser la répétabilité des analyses par leur centrage entre les plants asymptomatiques et symptomatiques.

IV.2. <u>Développement d'une étude métabolomique sur les COVs stockés dans les</u> plants asymptomatiques et symptomatiques

Ce travail est en cours de valoriation par une publication à soumettre dans Metabolomics. Cette étude présente l'optimisation de la méthode développée pour extraire et caractériser les compositions chimiques en COVs au sein des feuilles et des inflorescences de lavande et de lavandin. Elle expose également les effets du dépérissement sur les COVs stockés et propose des marqueurs chimiques pouvant être impliqués dans la maladie. Un bilan des résultats obtenus est réalisé à la suite de l'article.

In progress

Optimisation and application of a metabolomic workflow to characterize stored volatiles compounds involved in the lavender yellow decline disease

Émilie Stierlin^a, Florence Nicolè^b, Thomas Costes^c, Xavier Fernandez^a, Thomas Michel^a* ^aUniversité Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice UMR 7272, 06108 Nice, France ^bUniversité de Lyon, Université Jean Monnet, Laboratoire BVPAM, FRE CNRS INEE 3727 – EA 3061, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42000 Saint-Étienne, France ^cCentre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum, Aromatiques et Médicinales (CRIEPPAM), Les Quintrands, Route de Volx, 04100 Manosque, France

*Corresponding author. Tel.: +33 4 92 07 61 69; fax: +33 4 92 07 61 89 12 E-mail address: Thomas.MICHEL@univ-cotedazur.fr

Co-authors e-mail addresses: Emilie Stierlin: Emilie.STIERLIN@univ-cotedazur.fr Florence Nicolè: Florence.NICOLE@univ-st-etienne.fr Thomas Costes: Thomas.COSTES@crieppam.fr Xavier Fernandez: Xavier.FERNANDEZ@univ-cotedazur.fr

ABSTRACT:

Introduction The planthopper is the vector of stolbur phytoplasma, a cell wall-less-bacterium that is parasite responsible for the yellow decline disease of lavender in France. Phytoplasmas obstruct the phloem vessels from plant and are known to induce changes in the quantity and composition of secondary metabolites of diseased plants.

Objective By a metabolomic approach, the aim is to optimize the extraction protocol, to characterize the chemical composition of stored lavender and lavandin aerial part VOCs and to identify chemical markers involved in the yellow decline disease. The objective is to identify changes of chemical composition between asymptomatic and symptomatic plants.

Methods Samples from fine lavender and lavandin aerial parts were collected in field, then stored volatile compounds produced by fine lavender and lavandin were extracted in the
laboratory by ultrasound assisted extraction and analyzed by gas chromatography–mass spectrometry. Afterwards, multivariate statistical analysis has been performed using principal component analysis and partial least square regression to compare stored VOCs from asymptomatic to symptomatic plants.

Results By an optimized experimental design, we are able to see significant differences in volatile compounds content according to infection levels of the lavender yellow decline disease.

Conclusion Our efficient metabolomic approach have been developed to extract and characterize stored VOCs from lavender and lavandin leaves and inflorescences, and then to identify specific markers from symptomatic plants.

Keywords: UAE GC-MS; lavender; metabolomic; stored VOCs.

1 Introduction

Plants produce 100,000 to 200,000 different metabolites, including a wide variety of secondary metabolites such as alkaloids, terpenoids and phenolic compounds [36]. Among these metabolites, more than 1700 volatile compounds have been identified in plant emissions and are involved in the protection against abiotic or biotic stresses as repellents for herbivores or pathogens and to attract pollinators [279, 280].

Plants biosynthesize and store various volatile compounds in distinct tissues, whose composition and concentration may thus differ among appearance levels. These volatile compounds can be stored and emitted by any type of cell even if some species have developed particular storage structures such as glandular trichomes in Lamiaceae [166]. In glandular trichomes, high concentrations of specialized metabolites are synthetised and stored, including volatile terpenoids and phenylpropanoids [281].

Stored VOCs can be volatilized into the atmosphere by healthy and infected plants. To defend themselves and to repel enemies, the plant responds by releasing VOCs stored in the tissues of the attacked plants and/or by producing and emitting specific VOCs [282]. The synthesis of some compounds is induced only after stress and these VOCs can be emitted hours or days after an attack [283].

Green leaf volatiles are emitted from tissues very quickly under abiotic and biotic stress [51]. In addition, stored VOCs are directly involved in plant defense because of their toxicity against omnivorous herbivores, which have to change their eating habits. Thus, studying stored VOCs is interesting to understand the defense mechanisms involved by plants [64, 138].

In our study, we are focused on yellow decline disease of lavender. The stolbur phytoplasma (*Candidatus* Phytoplasma solani), a cell wall-less-bacterium, is the parasite responsible for this disease. The insect vector, the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae), transmits the pathogen during feeding on lavender phloem sap [22]. Phytoplasmas seem to be mainly present in the leaves of plants but they can move through the phloem [20, 23]. It is known that phytoplasmas induces changes in the quantity and composition of secondary metabolites of diseased plants [16]. For example, Mayer *et al..* 2008 proved that phytoplasma

(*C.* Phytoplasma mali) manipulates the behavior of its vector insect by emitted more β -caryophyllene. This compound attracts non-infected insects to infected plants but also repels insects which have the phytoplasma towards healthy plants, thus promoting the spread of the bacterium.

The volatile compounds present in lavender essential oils are widely studied and are extracted by two main extraction processes used in the flavors and fragrances industry; hydrodistillation and steam distillation [73, 75, 113]. To study VOCs stored in tissues, the use of organic solvent(s) is often employed to avoid the degradation of molecules by heating at high temperature [138]. Different non-polar solvents can be used such as cyclohexane [139], pentane [140], dichloromethane [141], or hexane [142].

Traditional extraction methods such as maceration, percolation, digestion, decoction or solid/liquid extraction with a Soxhlet apparatus are often replaced by more advanced extraction methods [284]. Ultrasound assisted extraction (UAE) increases the efficiency of solvents and allows working at lower temperatures to avoid damage due to high temperatures [285].

The objectives of this study were: (i) to optimize an extraction protocol and to characterize the chemical composition of stored lavender and lavandin aerial part VOCs; (ii) to see the effect of symptoms on chemical compositions, due to the yellow decline disease; and (iii) to identify chemical markers involved on this decline.

2 Materials and methods

2.1 Plant Material

Two plants of *grosso*, the most cultivated variety of lavandin (L. × *intermedia*), were used to optimize the method. Samples were obtained from one-year plants purchased in January 2017 at the Petruccioli garden center (Nice, France).

Field samplings were carried out in Monieux (Vaucluse, région SUD-Provence-Alpes-Côte d'Azur). The samplings were made during the lavender peak flowering in July 2017 on 7713 fine lavender and *abrial* lavandin. Plant samples were divided into two field plots: 7713 plot ((lat/lon) 44.06367, 5.34023; Alt 860m), and *abrial* plot ((lat/lon) 44.08057, 5.37223; Alt 660m). Lavender seedlings were planted in 2011-2012 for fine lavender and in 2010-2011 for lavandin. Ten asymptomatic (level 1) and ten symptomatic (levels 2 and 3) plants from each variety were selected and identified by CRIEPPAM (Centre Régionalisé Interprofessionnel d'Expérimentation en Plantes à Parfum Aromatiques et Médicinales, Manosque) depending on their symptom's levels: (1): plants without symptoms; (2): plants slightly yellowing, with fewer floral scapes; (3): plants having almost no floral stems, but with some leaves; (4), dead plants, no floral scapes and no green leaves (Figure IV-6).



Figure IV-6. Illustration of yellow decline on lavender under cultivation. Infection rate can be separated in four levels: (1), plants without symptoms; (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes; (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves; (4), dead plants, no floral scapes and no green leaves (modified from CRIEPPAM).

The inactivation of biological reactions is generally done by freezing with liquid nitrogen [103]. Thus, the fifteen aerial part, separate leaves and inflorescences, are immediately freezed with liquid nitrogen (Air Liquide France Industrie, Saint Priest, France), stored in dry ice (Air Liquide France Industrie, Saint Priest, France) for transport, and then frozen at -80°C in the laboratory before drying.

2.2 Pre-treatment of plant material

The field-samples (leaves and inflorescences) were 48h freeze-dried using a Lyovac GT2 freeze dryer (G. Beyneix S.A., Marseille, France) and then ground into a fine powder with 50 mL grinding jar in a Mixer Mill MM 301 (Retsch GmbH & Co, Haan, Germany) for 30 to 40 sec (respectively for leaves and inflorescences) at 30 Hz with one 25 mm grinding ball. The powders have been stored in glass vials at ambient temperature until analysis.

Effects of five pre-treatments of plant material were investigated on *grosso* leaf samples: (1) fresh material, (2) 5 days freezing, (3) 10 days air drying, (4) 15 days freezing combined with 36h freeze-drying, (5) 36h freeze-drying. Before extraction, samples were ground in liquid nitrogen (1,2) or by a mixer (3,4,5).

2.3 Ultrasound assisted extraction (UAE)

Inflorescence or leaf powder (50, 100 or 150 mg) was extracted in an FB 15049 ultrasonic bath (Fisher Scientific, Loughborough, UK) with 1 mL of distilled *n*-hexane and 100 μL/L *n*-dodecane as internal standard. *n*-hexane and *n*-dodecane were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

After sonication for 30 min, the samples were centrifuged 10 min to 4000 rpm; the temperature was maintained at around 20°C. Afterwards supernatants were recovered and analyzed by gas-chromatography mass-spectrometry (GC-MS). Two pools for each variety were made from 30 μ L of each sample (one for inflorescence samples and one for leaf samples). All samples were stored at 4°C prior to analysis by GC-MS.

2.4 Gas Chromatography–Mass Spectrometry analyses (GC-MS) analysis of VOCs

GC-MS analysis was performed on a gas chromatograph GC Agilent 6890 system coupled to an Agilent 5973 mass-selective detector (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and connected to a multifunction automatic sampler (Combi-Pal, CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

The analyses were performed on a HP-1 column (50m x 200µm, 0.33µm film thickness; Agilent Technologies). 1µl of sample was injected in splitless mode (split vent: 80 mL/min, 1 min), and introduced into the gas chromatographic (GC) injector equipped with a Gooseneck 4mm x 6.5 x 78.5 splitless insert (Restek, State College, PA, USA). The injector temperature was set to 250°C, and the oven temperature was programmed to first rise from 40°C to 220°C at 2°C/min, then from 220°C to 270°C at 20°C/min and kept isothermally at 270°C for 5 min. The transfer line temperature was fixed at 280°C. The carrier gas was helium in constant flow mode at 1 mL/min. A solvent delay of 7 min was selected. Mass spectra were recorded in electronic ionisation (EI) mode at 70 eV, and scanning the m/z 35-500 range (3.15 scan/s). Data acquisition were carried out using Chemstation (Agilent).

2.5 Identification of compounds

The identification of compounds involved the comparison of mass spectra with those recorded by internal or commercial mass-spectral libraries (NIST and Wiley) as well as the comparison of linear retention indices (LRI) with those in the literature (NIST, ESO). All identifications correspond to putatively identified compounds (level 2) because no standards were used in this study. Retention indices (RI) were calculated using a formula according to Van den Dool and Kratz and according to the retention times of standard n-alkanes C_6-C_{24} mixture (SUPELCO). Alkanes mixture diluted to 0.1% in dichloromethane were analyzed by GC-MS according to the method described previously.

2.6 Statistical analyses

All statistical analyses were done on R v3.5.1 software (R Foundation, Institute for Statistics and Mathematics, Austria) (Annexe 17 and Annexe 18).

2.6.1 Spectra processing

Chromatographic data were exported to NetCDF format. To obtain the final matrix with samples in row and retention times in columns, data were aligned using eRah R package [258]. The raw data of the samples are classified into two folders: asymptomatic and symptomatic plants. m/z 73, 74, 75, 147, 148, 149, 207 and 208 were excluded for data processing, since these signals correspond mainly to siloxane derivatives. The parameters set for the deconvolution were as follows:

	samples for	inflorescence	leaf
	optimisation	samples	samples
min peak width	2.5	3	3
min peak height	4000	10000	4000
noise threshold	2000	2000	2000

The parameters set for the alignment were as follows: min.spectra.cor=0.90, max.time.dist=20, mz.range=40:450. The minimum number of samples was set to 3 for the missing compound recovery step.

For each sample, the area corresponding to one retention time was adjusted to the ratio: (abundance of internal standard for each sample) / (maximum abundance obtained for the internal standard).

2.6.2 Discriminant analyses

Principal component analysis (PCA) was used to represent all the individuals using the fviz_pca_ind function (factoextra package). To separate the chemical profiles between symptomatic and asymptomatic plants, a Partial Least Square - Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed with the *plsda* function of mixOmics R package [179], after normalisation by the *clr* function (Hotelling package). The performance of the PLS-DA model was evaluated using the perf function (mixOmics package). All compounds with a VIP (Variable Importance in Projection) score were considered. Package ade4 and RVAideMemoire were respectively used to carry out graphical representation and to select discriminant compounds.

2.6.3 Mean comparison of VIP compounds between asymptomatic and symptomatic plants Normality and homoscedasticity of the data was respectively tested with a Shapiro and Levene test. For non-parametric compounds, Mann and Whitney tests were performed. The *multtest.gp* function of the RVAideMemoire package was used to give corrected p-value for each metabolite. The statistical significance level was fixed to 0.05.

3 Results and discussion

In this study, a metabolomic analysis was performed on lavender leaves and inflorescences collected in fields in accordance with different symptom's levels. The metabolomic analysis of

plant volatile compounds consists of three linked main experimental steps: sample preparation, data acquisition (GC-MS), and data processing with biomarker identification (Figure IV-7) [286]. For example, the analysis method, generally automated, will determine how the sample should be prepared.



Figure IV-7. Experimental design implemented in the study of stored VOCs of lavender and lavandin.

3.1 Sample preparation and VOCs extraction

To carry out a metabolomic study, it is important to control all the steps of the process: from sampling to data processing. Sample preparation (usually consisting of harvesting, drying, extraction and preparation for analysis) must be simple and easy to set up a large number of samples. The aim is to limit the variabilities and bias of the results.

The solvent and extraction method were chosen based on the literature. *n*-hexane is often used to analyze stored VOCs from plants [114, 276]. Shafaghat, *et al.* (2012) used *n*-hexane to extract and analyse by GC-MS the compounds present in lavender leaves and stems. In their study, they used the Soxhlet device to extract VOCs. However, this extraction often takes several hours, requires a lot of solvent that must be evaporated at the end of the extraction to concentrate the samples and is not suitable for our sampling method due to the amount quantity of raw material necessary [287]. Thus ultrasonic assisted extraction was chosen to extract the VOCs stored in lavender leaves and inflorescences due in particular to the ease of use [276]. According to Kimbaris *et al.* (2006), the extraction time has been set at 30 minutes.

The preliminary tests focused on the optimisation of the following steps:

- Plant material preparation (pre-treatment)
- Extraction of metabolites of interest
- Analysis of metabolites by GC-MS

3.1.1 In-field sampling

Ten asymptomatic and ten symptomatic plants of each variety were selected as biological replicates according to their symptoms. To avoid metabolic changes, such as those due to enzymatic degradation or oxidation, the plant material was immediately frozen in liquid nitrogen [103, 288].

3.1.2 Pre-treatment

Before the extraction of the compounds of interest, drying of the plant material is often carried out and necessary in the case of a metabolomic study [269]. Indeed, the presence of water in plant samples can modify metabolites by promoting enzymatic reactions. We therefore tried to evaluate the analysis of fresh material (1) but also the influence of freezing (2) on the samples compared to drying conditions (air drying (3) or freeze-drying (5)).

According to Figure IV-8 (A), the chemical composition of extracts from air-dried (3) leaves seems less rich than the other in particular by the lower abundance of coumarins (*). The other phytochemical profiles seem similar, although the differences in abundance between the sesquiterpenes detected appear to vary.

A PCA revealed the clustering of samples according to the different pre-treatments (Figure IV-8 (B)). The group of air-drying samples (3) seems to have a different VOC composition since it is very far from the other sample groups explained by the separation on the horizontal axis (Dim1: 64.3%). The use of fresh materials (1) showed a high variability in the variables, explained by the separation on the vertical axis (Dim2: 10.5%). In addition, to use fresh materials, sampling should be close to the laboratory. Variabilities were also observed for frozen extracts (2).

Finally, two conditions with similar results were selected: freeze-drying (5) and freezing combined with freeze-drying (4). The combination of "freezing+freeze-drying" was chosen to keep the sample frozen for transport after introducing it into liquid nitrogen and before freeze-drying in laboratory.



Figure IV-8. Chromatographic profiles (A) and PCA score plots (B) of compounds emitted by *grosso* lavandin leaves depending on pre-treatments.

3.1.3 Sample concentration

About sixty peaks could be detected with a concentration of 150 mg/mL compared to about forty for 100 mg/mL and about fifty for 50 mg/mL. However, by statistical analysis realized on the number of compounds and the total abundance of compounds detected in each sample (Mann and Whitney test), no significant differences were observed between samples from the three concentrations tested (p-value>>>0.05). The objective is to be able to extract and detect as many compounds as possible using the least amount of plant material. Thus, the concentration of 50 mg/mL was chosen.

3.2 Analytical method optimization

3.2.1 Repeatability of analysis

To ensure the reliability of the results, analytical validation is necessary. Thus, analytical repeatability was evaluated by injecting ten times the same sample and was based on the variation coefficient, expressed as a percentage (% CV). This CV corresponds to the ratio of standard deviation to mean of retention time or abundance for each compound and the compound is considered to be repeatable when the CV<20%.

Table IV-1. Coefficients of variation (CV) of retention times and abundances of thirteen compounds detected in lavandin *grosso* by GC-MS.

Compound	CV retention time (%)	CV abundance (%)
1	0.02	7.31
2	0.02	25.88
3	0	7.36
4	0.01	7.25
5	0	6.89
6	0.42	55.99
7	0.19	41.47
8	0.01	16.87
9	0.02	18.62
10	0.08	29.22
11	0	6.74
12	0.01	14.39
13	0.01	6.65

Out of ten injections, the average number of peaks detected was 206 ± 39 . Even if high variations were highlighted in abundances from the replicates of four compounds (CV>20%), variations probably due to the mass spectrometer not enough sensitive to quantitative analyses, good repeatability in retention times could be observed for all the thirteen compounds studied (Table IV-1).

3.2.2 Analytical deviation

For field samples, the analytical deviation was evaluated by adding an internal standard in all samples to adjust the concentration. In a metabolomic study, the organization of the analytical sequence is important [289]. The samples analyzed in triplicate were randomly distributed throughout the sequence. At the beginning of the injection sequence, the system was

conditioned by 10 pool injections. The same pool was injected during the sequence, every 9 samples. A total of 340 injections including 240 samples of leaves and inflorescences from 7713 lavender and *abrial* lavandin were analyzed. *n*-dodecane, a stable molecule that does not interfere with lavender molecules, was used as an internal standard to correct the data before statistical analysis.



Figure IV-9. Evolution of the abundance of the internal standard during the analytical sequence of asymptomatic (asympto), symptomatic (symptom) leaves or pools from *7713* lavender (A) or *abrial* lavandin (B).

The concentration of internal standard increases during the analytical sequence in both pools and samples (Figure IV-9). This increase may be due to the evaporation of the extraction solvent. Thus, the internal standard aims to avoid variations related to injection and to remove possible effects due to analysis or deviations from the device. In contrast to the strong variations observed for lavender samples (Figure IV-9 (A)), based upon the abundance, the *n*dodecane signal was approximately stable throughout the experiment for all *abrial* lavandin leaf samples (Figure IV-9 (B)). The *n*-dodecane internal standard showed a good repeatability response indicating robustness in terms of both the extraction and the GC–MS analytical repeatability.

3.3 Characterization of fine lavender/lavandin stored VOCs

The compositions from 7713 fine lavender and *abrial* lavandin are presented in Table IV-2 and the chromatograms from fine lavender are shown in Figure IV-10. Fifty different compounds were detected and identified including eighteen compounds in lavender inflorescences, forty-seven compounds in lavandin inflorescences, and only five and seven compounds identified in respectively fine lavender and lavandin leaves. Six compounds were detected and remained not identified (Annexe 10). One of them represent more than 15% of the total area of fine lavender inflorescences. Oxygenated monoterpenes were the main class of compounds emitted by lavender and lavandin inflorescences. Among them, linalyl acetate, borneol, linalool, camphor and 1,8-cineole were the main molecules identified on *abrial* lavandin. In lavender leaves, only borneol, camphor and 1,8-cineole were identified. Linalyl acetate and linalool have not been identified in any leaf extracts. Considering the hydrocarbon monoterpenes, β -myrcene was the major compound identified in inflorescences from 7713 fine lavender but not detected in the leaves.



Figure IV-10. The overlay total ion chromatograms (TICs) of compounds detected by UAE GC-MS analysis on 7713 fine lavender extracts from symptomatic/asymptomatic inflorescences (a/b) or leaves (c/d).

			Area (% ± SD)	[a]								
LRI (calc.) LRI (lit.)		LRI (calc.) LRI (lit.)		Compound	7713 inflores	cences	7713 leaves		abrial inflorescences		abrial leaves	
			(A)	(S)	(A)	(S)	(A)	(S)	(A)	(S)		
754	786	3-hexanone	-	-	-	-	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	-	-		
768	797	3-hexanol	-	-	-	-	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	-	-		
929	938	lpha-pinene ^[b]	-	-	-	-	0.42 ± 0.13 ^[c]	0.38 ± 0.17	-	-		
943	941	camphene ^[b]	-	-	-	-	0.25 ± 0.06 ^[c]	0.24 ± 0.06	-	-		
967	977	1-octen-3-ol ^[b]	-	-	-	-	0.26 ± 0.06	0.19 ± 0.05	-	-		
972	974	β -pinene ^[b]	-	-	-	-	0.9 ± 0.28 ^[c]	0.73 ± 0.3	-	-		
987	983	β-myrcene ^[b]	2.41 ± 2.41	2.28 ± 1.97	-	-	0.87 ± 0.31 ^[c]	1.07 ± 0.5	-	-		
1002	-	NI-1	-	-	-	-	0.18 ± 0.19	0.23 ± 0.23	-	-		
1017	1022	<i>o</i> -cymene ^[b]	-	-	-	-	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	-	-		
1027	1030	1,8-cineole ^[b]	-	-	0.05 ± 0.07	0.02 ± 0.04	3.67 ± 0.47 ^[c]	3.43 ± 0.42	0.07 ± 0.04 ^[c]	0.14 ± 0.06		
1032	1027	<i>(Z)</i> -β-ocimene ^[b]	0.42 ± 0.44	0.34 ± 0.37	-	-	0.15 ± 0.1 ^[c]	0.19 ± 0.14	-	-		
1042	1046	<i>(E)</i> -β-ocimene ^[b]	0.95 ± 0.97	0.84 ± 0.81	-	-	0.52 ± 0.24 ^[c]	0.67 ± 0.4	-	-		
1063	1066	<i>trans</i> -sabinene hydrate ^[b]	-	-	-	-	0.17 ± 0.08	0.28 ± 0.24	-	-		
1067	1070	linalool oxide ^[b]	1.78 ± 1.78	1.56 ± 1.68	-	-	-	-	-	-		
1069	1070	<i>cis</i> -linalool oxide ^[b]	-	-	-	-	1 ± 0.45	1.07 ± 0.63	-	-		
1083	1070	trans-linalool oxide ^[b]	-	-	-	-	0.91 ± 0.43	1.03 ± 0.7	-	-		
1093	1086	linalool ^[b]	8.96 ± 3.69	7.84 ± 3.28	-	-	9.03 ± 1.23 ^[c]	9.47 ± 1.72	-	-		
1107	1110	1-octen-3-yl acetate ^[b]	-	-	-	-	0.37 ± 0.11	0.34 ± 0.07	-	-		
1134	1142	camphor ^[b]	-	-	-	-	6.28 ± 0.47 ^[c]	6.23 ± 0.6	$0.23 \pm 0.14^{[c]}$	0.39 ± 0.15		
1141	1118	trans-p-mentha-2,8-dienol	-	-	-	-	0.29 ± 0.16	0.31 ± 0.19	-	-		
1149	1145	<i>trans</i> -pinocarveol ^[b]	-	-	-	-	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	-	-		
1159	1162	borneol ^[b]	0.84 ± 0.45	0.82 ± 0.96	0.37 ± 0.17	0.79 ± 0.28	12.36 ± 0.9 ^[c]	12.79 ± 1.04	$0.18 \pm 0.1^{[c]}$	0.25 ± 0.08		
1160	1149	lavandulol ^[b]	1.29 ± 0.55	1.55 ± 1.27	-	-	-	-	-	-		
1166	1173	cis-linalool oxide (pyranoid)	0.73 ± 0.35	0.54 ± 0.3	-	-	0.15 ± 0.09	0.22 ± 0.09	-	-		
1167	1172	terpinene-4-ol ^[b]	0.78 ± 0.38	0.55 ± 0.3	-	-	0.59 ± 0.09 ^[c]	0.64 ± 0.13		-		

Table IV-2. Relative percentages of stored VOCs from symptomatic and symptomatic 7713 fine lavender and *abrial* lavandin and identified by GC-MS.

Chapitre IV. Étude métabolomique sur les COVs stockés

1178	1193	hexyl butanoate ^[b]	1.24 ± 0.61	0.66 ± 0.36	-	-	1.83 ± 0.57	1.8 ± 0.64	-	-
1179	1184	$lpha$ -terpineol $^{[b]}$	0.8 ± 0.45	0.42 ± 0.23	-	-	0.23 ± 0.08	0.19 ± 0.07	-	-
1228	1228	bornyl formate	-	-	-	-	0.33 ± 0.09 ^[c]	0.31 ± 0.12	-	-
1233	1243	carvone ^[b]	-	-	-	-	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	-	-
1249	1251	linalyl acetate ^[b]	7.48 ± 0.91	11.42 ± 7.57	-	-	23.32 ± 3.79 ^[c]	24.29 ± 4.31	-	-
1297	1290	lavandulyl acetate ^[b]	2.5 ± 1.27	2.27 ± 1.3	-	-	1.89 ± 0.53 ^[c]	2.27 ± 0.8	-	-
1333	-	NI-2	15.66 ± 8.69	13.88 ± 7.2	-	-	9.03 ± 2.7	9.38 ± 4.39	-	-
1364	1364	neryl acetate ^[b]	-	-	-	-	0.35 ± 0.25 ^[c]	0.29 ± 0.17	-	-
1369	1381	geranyl acetate ^[b]	1.18 ± 0.92	1.22 ± 0.78	-	-	1.17 ± 0.41	0.46 ± 0.26	-	-
1382	-	NI-3	0.01 ± 0	0.01 ± 0	-	-	0.4 ± 0.09	0.41 ± 0.17	-	-
1391	1356	lpha-terpinyl acetate ^[b]	-	-	-	-	0.22 ± 0.07	0.26 ± 0.11	-	-
1400	1426	<i>p</i> -methylolphenol	-	-	-	-	0.53 ± 0.14	0.53 ± 0.18	-	-
1410	1385	daucene ^[b]	-	-	-	-	0.08 ± 0.05	0.1 ± 0.08	-	-
1407	1414	coumarin ^[b]	1.21 ± 1.02	0.68 ± 0.52	0.38 ± 0.39	0.13 ± 0.13	4.71 ± 2.59	2.78 ± 1.96	0.45 ± 0.3	0.22 ± 0.26
1421	-	NI-4	0.53 ± 0.37	0.6 ± 0.32	-	-	-	-	-	-
1421	1432	<i>trans</i> - α -bergamotene ^[b]	-	-	-	-	0.07 ± 0.03	0.1 ± 0.07	-	-
1422	1418	β -caryophyllene ^[b]	0.96 ± 0.71	1.06 ± 0.6	-	-	2.76 ± 1.09 ^[c]	3.54 ± 2.46	-	-
1452	1454	α -humulene ^[b]	2.21 ± 1.67	3.04 ± 1.62	-	-	0.45 ± 0.21 ^[c]	0.56 ± 0.39	-	-
1456	1456	<i>(E)</i> -β-farnesene ^[b]	-	-	-	-	1.01 ± 0.23 ^[c]	1.52 ± 0.65	-	-
1474	1522	δ-cadinene ^[b]	-	-	-	-	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.05	-	-
1484	1488	epi-bicyclosesquiphellandrene	-	-	-	-	0.53 ± 0.27	0.58 ± 0.21	-	-
1490	1490	germacrene D ^[b]	-	-	-	-	0.07 ± 0.04 ^[c]	0.11 ± 0.05	-	-
1495	1526	β -sesquiphellandrene ^[b]	-	-	-	-	0.63 ± 0.62	0.81 ± 0.75	-	-
1493	-	NI-5	0.88 ± 0.54	0.44 ± 0.42	-	-	-	-	-	-
1507	1473	linalyl isovaolerate	-	-	-	-	$0.34 \pm 0.08^{[c]}$	0.36 ± 0.11	-	-
1520	1515	γ-cadinene ^[b]	-	-	0.88 ± 0.41	0.81 ± 0.38	1.61 ± 0.29	1.43 ± 0.22	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.01
1576	-	NI-6	0.32 ± 0.18	0.36 ± 0.14	-	-	-	-	-	-
1577	1581	caryophyllene oxide ^[b]	0.48 ± 0.23	0.5 ± 0.17	-	-	0.45 ± 0.05	0.47 ± 0.08	-	-
1634	1634	α -caryophylladienol	-	-	0.01 ± 0.02	0.09 ± 0.08	-	-	-	-
1650	1655	α -cadinol ^[b]	-	-	-	-	1.42 ± 0.43 ^[c]	1.19 ± 0.38	$0.02 \pm 0.01^{[c]}$	0.02 ± 0.01
1696	1644	7-methoxycoumarin ^[b]	-	-	-	-	3.8 ± 2.03	2.52 ± 1.8	0.14 ± 0.06	0.06 ± 0.04

Chapitre IV. Étude métabolomique sur les COVs stockés

Monoterpene hydrocarbons	3.78 ± 3.82	3.46 ± 3.15	-	-	3.16 ± 1.13	3.33 ± 1.63	-	-
Oxygenated monoterpenes	23.17 ± 8.82	24.82 ± 15.65	0.42 ± 0.24	0.81 ± 0.32	59.8 ± 8.74	61.64 ± 10.72	0.48 ± 0.28	0.78 ± 0.29
Hydrocarbon sesquiterpenes	3.17 ± 2.38	4.1 ± 2.22	0.88 ± 0.41	0.81 ± 0.38	8.67 ± 3.29	10 ± 5.31	0.04 ± 0.03	0.05 ± 0.02
Oxygenated sesquiterpenes	0.48 ± 0.23	0.5 ± 0.17	-	-	1.87 ± 0.48	2.85 ± 0.84	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Total compounds	23	23	5	5	50	50	7	7
^[a] area expressed as a percentage of the total GC area.								

^[c]reported in literature on the same variety [81].

(A), asymptomatic. (S), symptomatic.

LRI (calc.), linear retention index calculated according to the retention times of standard n-alkane C₆-C₂₄ mixture.

LRI (lit.), linear retention index reported in the literature (NIST, ESO).

SD, standard deviation.

-, absent.

Guitton *et al.* (2010) have collected aerial parts samples of different lavender varieties (*7713*, *C15-50*, *matherone*) and lavandin varieties (*grosso*, *super*, *certitude*), then they have extracted the VOCs by a maceration of the inflorescences and leaves in hexane overnight at 4°C in order to compare the terpenoid compositions according to the organs [116]. They showed that VOCs were ten times more accumulated in blooming heads and central inflorescence stems than in leaves from several varieties of fine lavender including *7713*. Interestingly, as in our study, linalool and linalyl acetate, which are the main compounds of inflorescences, were not identified in hexanic leaf extracts whereas borneol, 1,8-cineole and camphor were found on lavandin leaf extracts.

In the study by Zagorcheva *et al.* (2013), they have analyzed the VOCs content in the aerial parts of different lavender cultivars. GC-MS analysis of hexanic extracts have highlighted a total of thirty-two VOCs including linalool and linalyl acetate as major compounds. However, compared to our study, borneol was only slightly extracted and β -myrcene was not detected [131]. From the fifty compounds identified in our study on *abrial* lavandin inflorescences, only twenty-one compounds have been identified in the same variety in literature [81].

To observe the changes of volatile compounds between asymptomatic and symptomatic plants, we first compared the total ion chromatography (TIC) (Figure IV-10). The number and abundance of compound peaks do not appear to differ according to the asymptomatic/symptomatic characteristics of the plants. Finally, to identify markers between asymptomatic and symptomatic plants, discriminant analyses have been performed.

3.4 Changes of VOC content in lavender and lavandin aerial parts

To perform statistical analyses, the areas of each compound, obtained from GC-MS analyses were normalized by internal standard. To visualize all samples, a principal component analysis (PCA) was performed on the GC-MS data.

3.4.1 7713 fine lavender stored VOCs variability

The score plot of the first two principal components from leaf samples was shown in Annexe 11. The pools (in blue) are grouped in the center, and also synonym of a good analysis. On either side of the pools, the samples are grouped according to their level of infection (level 1 in green and level 3 in red).

The PLS-DA score plot performed within leaves from 7713 fine lavender significantly differentiate asymptomatic (level 1) and symptomatic (level 3) groups with small percentage of misclassification (12.9%) and significant difference between the levels (P-value < 0.05). Due to the low number of volatile compounds present in leaf extracts, few compounds have influenced the model to separate samples according to infection levels. On the leaf 7713 fine lavender extracts, only borneol as symptomatic marker and coumarin as asymptomatic marker had a VIP score>1. However, it can be noted that the relative abundances for these

compounds between levels are very significant: p < 0.0001 for borneol and p < 0.01 for coumarin.

A significant difference between level 1 and level 3 could also be observed on inflorescences from *7713* fine lavender: small percentage of misclassification (1.21%) and significant difference between the levels (P-value < 0.05) (Figure IV-11). 16 discriminant compounds with a VIP score > 0.9 separate the inflorescences stored VOCs between infection levels 1 and 3. Among these compounds, different chemical families are represented such as monoterpenes (six oxygenated monoterpenes and three hydrocarbon monoterpenes), sesquiterpenes (one oxygenated sesquiterpene) and coumarins (one coumarin). Three of these markers remain unidentified including probably one oxygenated monoterpene (m/z 168) and one acetate (m/z 196) (NI-2, NI-3 and NI-6). According to Figure IV-12, four compounds are significantly more emitted by non-symptomatic plants: (*E*)-2-hexenyl butanoate (P-value: 0.002), α -terpineol (0.002), β -sesquiphellandrene (0.013), and (*Z*)-3-hexenyl butanoate (0.043).



Figure IV-11. PLS-DA plots of stored VOCs from 7713 fine lavender inflorescences depending on plant levels of infection: asymptomatic or symptomatic plants. (A), plants without symptoms (green); (S), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red).



Figure IV-12. Changes in the relative abundance of the identified discriminant compounds after normalisation with the abundance of the internal standard, according to their VIP score (VIP score>0.9) derived from PLS-DA on 7713 fine lavender inflorescences and depending on plant levels of infection. (1), plants without symptoms (green); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red) (Mann & Whitney non-parametric test - *p < 0.05; **p < 0.01).

3.4.2 Abrial lavandin stored VOCs variability

The distribution into groups of levels is less obvious in the case of leaf extracts from lavandin *abrial* (Annexe 12). PLS-DA score plots performed on *abrial* lavandin leaves do not reveal significant differences between levels 1 to 3 (NMC > 20 % and P-value > 0.05). Only the discriminant analysis carried out on levels 1 and 2 showed a significant separation: small percentage of misclassification (6.83%) and P-value < 0.05. Three compounds have been involved to discrimination between the two levels of infection 1 and 2 (VIP score>1): 1,8-cineole, α -cadinol and 7-methoxycoumarin. Only 1,8-cineole appears to be a significant marker of symptomatic plants (****p < 0.0001).



Figure IV-13. PLS-DA score plots of stored VOCs from abrial lavandin inflorescences depending on asymptomatic and symptomatic plants (A) or on plant levels of infection (B, C, D). (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3) plants having almost no floral stems, but with some leaves (red).

PLS-DA score plots performed on *abrial* lavandin reveal significant differences between levels 1 to 2 (Figure IV-13 (C)) and also between levels 1 to 3 (D): small percentage of misclassification (< 15 %) and P-value << 0.05. 43 compounds with a VIP score>1 participate in the separation into distinct groups between levels 1 and 2 of lavender inflorescence extracts. Among these 43 compounds, two of them, probably oxygenated monoterpenes, have not yet been identified (NI-3 and NI-5). Due to the abundance of markers, only compounds with a VIP score > 1.5 were selected. The abundances of these compounds between levels 1 and 2 are presented in Figure IV-14 as well as their abundance at level 3. Only caryophyllene oxide and germacrene D did not have a significant difference between infections levels 1 and 2 (Figure 9(A)). Five compounds are overexpressed in symptomatic plants (level 2): borneol (P-value: 0.001), (*E*)- β -farnesene (0.002), linalyl isovalerate (0.02), lavandulyl acetate (0.0004), and β -caryophyllene (0.004). For these compounds, an increase in their abundance is observed at the beginning of infection (level 2), then a decrease in stored compounds appears at level 3. Significant difference has been observed only between the relative abundances of levels 2 and 3 for camphene hydrate (*p < 0.05).



Figure IV-14. Changes in the relative abundance of the identified discriminant compounds after normalisation with the abundance of the internal standard, according to their VIP score (VIP score>1.5) derived from PLS-DA on *abrial* lavandin inflorescences and depending on plant levels 1-2 (A) or 1-2-3 (B) of infection. (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red) (Mann & Whitney non-parametric test - *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

3.4.3 Effect of the yellow decline disease symptoms on emitted and stored VOCs from fine lavender and lavandin

This metabolomic study made it possible to extract by UAE and to characterize by GC-MS the VOCs content in the leaves and inflorescences of two species, lavender and lavandin. Significant differences were observed between VOCs stored by plants with symptoms of lavender decline disease and VOCs from plants without symptoms. According to literature, few compounds have been extracted from the leaves compared to inflorescences, since the main site of accumulation of volatile terpenes is found in the calyxes of plants [34, 116].

Before *in-field* sampling of the aerial parts, the VOCs emitted in the field were trapped by dynamic headspace extraction (DHS) on the same 7713 fine lavender and *abrial* lavandin plants [291]. Significant differences in emissions were found between asymptomatic and symptomatic plants of the two varieties. Among the discriminant compounds identified (VIP score > 0.9), four markers are common between stored VOCs and emitted VOCs from fine lavender (terpinen-4-ol, β -caryophyllene, linalyl acetate and linalool) and nine common markers from lavandin including β -caryophyllene, lavandulyl acetate, β -farnesene and linalool. When we compare the discriminant emitted compounds to stored compounds obtained from the two varieties, only β -caryophyllene is common. However, the trends are not similar between the two species: the compound is over-expressed by asymptomatic lavender plants whereas it is over-expressed by symptomatic lavandin plants. For *abrial* emissions, lavandulyl acetate and β -farnesene are the most discriminant compounds overexpressed by symptomatic plants. The production of these two compounds is also significantly more important in symptomatic *abrial* inflorescences (P<0.001).

Yvin *et al.* (2018) have also studied both emitted and stored VOCs of different varieties of lavender and lavandin. For example, they have highlighted significant differences between the VOC content of symptomatic and asymptomatic plants on *gabelle* fine lavender in laboratory. Among the discriminating compounds identified, β -caryophyllene was the compound with the highest VIP score in inflorescence extracts but absent from leaf extracts. In addition, a complementary study of VOCs was carried out in the field on three lavandin varieties (*super, abrial* and *grosso*) and one fine lavender variety (*maillette*). Lavandulyl acetate, β -farnesene and borneol have been identified by Yvin *et al.* as discriminant emitted compounds over-expressed by symptomatic plants. These compounds have also been identified as discriminant compounds in our study on stored VOCs from *abrial* inflorescences.

Finally, the synthesis of lavandulyl acetate and β -farnesene is stimulated in symptomatic lavandin inflorescences and leads to a significant increase in their field emissions. In addition, the production of β -caryophyllene in symptomatic plants is therefore promoted and leads to an increase in emissions of this compound. The efficacy of these potential markers of symptomatic plants must also be validated by choice tests performed on *H. obsoletus* and lavender and assays in their natural environment.

Conclusion

To study stored VOCs from 7713 fine lavender and *abrial* lavandin by a metabolomic approach, all steps of the study, from field sampling to data processing, were defined in order to obtain reliable results. Thus, to extract and analyze the stored VOCs from the aerial parts of lavender and lavandin, the pre-treatment method of the raw material was optimized (choice to combine freezing and freeze-drying), as well as the concentration of the extracts (50 mg/mL) and then the repeatability of the analytical method was also tested.

By this optimized experimental design, fifty stored VOCs, mainly oxygenated monoterpenes, from lavender and lavandin leaves and inflorescences were identified. We were also able to differentiate volatile compounds stored from asymptomatic and symptomatic leaves and inflorescences of the two species studied (p < 0.05, and NMC < 20 %). In lavandin species, specific markers of symptomatic plants could also be detected among the VOCs stored in the leaves (1,8-cineole) or in the inflorescences (borneol, *(E)*- β -farnesene, linalyl isovalerate, lavandulyl acetate, germacrene D, and β -caryophyllene). The abundance these compounds seems to change according to the infection levels of the lavender yellow decline disease. For some compounds such as borneol, *(E)*- β -farnesene, and β -caryophyllene, an increase in their abundance was observed at the beginning of infection (level 2), then a decrease in these stored compounds have been highlighted in the context of lavender decline. These results might give a better characterization of symptomatic plants and thus better control the disease.

To better understand the chemical interactions involved on the yellow decline of lavender between lavender, phytoplasma, and insect, more studies on induction of the synthesis and accumulation of VOCs after infection have to be done.

Author Contributions ES performed the experiments and analyzed the data. ES, FN, XF and TM wrote the article. FN, TC, XF and TM supervised the research work. All authors read and approved the article.

Acknowledgements

The authors thank all the partners involved in the EUCLIDE project (n° 154827) co-funded by the SPLP Funds (http://www.sauvegarde-lavandes-provence.org/fr/) and the PACA region. Eric Chaisse is also thanked for its support, expertise and comments on the project.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare.

Research involving human or animal rights This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Toutes les étapes de l'étude métabolomique ont été optimisées (Figure IV-7) : collecte en champ, congélation, lyophilisation et broyage des échantillons, extraction des COVs par extraction assistée aux ultrasons (UAE) à l'aide du n-hexane (50 mg/mL), centrifugation et récupération du surnageant pour les analyses en GC-MS. Ainsi, cette étude métabolomique a permis d'extraire les COVs stockés dans les feuilles et les inflorescences de lavande et de lavandin par UAE et de caractériser 56 composés par GC-MS. Après analyses discriminantes, des différences significatives ont été observées entre les COVs stockés par les plantes symptomatiques au dépérissement et les COVs des plantes asymptomatiques. Pour la première fois, des modifications d'abondances en composés stockés suivant les niveaux d'infection ont été mis en évidence dans le contexte du dépérissement de la lavande. Dans le cas des études réalisées sur le lavandin abrial, des marqueurs spécifiques de plantes symptomatiques ont pu être détectés parmi les COVs stockés dans les feuilles (1,8-cinéole) ou dans les inflorescences (bornéol, (E)- β -farnésène, isovalérate de linalyle, acétate de lavandulyle, germacrène D et β -caryophyllène). L'abondance de trois de ces composés (bornéol, (E)- β -farnésène et β -caryophyllène) a changé de façon significative selon les niveaux d'infection au dépérissement. Une augmentation de leur abondance a été observée au début de l'infection (niveau 2), puis une diminution de ces composés stockés apparaît au niveau 3.

Ces résultats pourraient permettre une meilleure caractérisation des plantes symptomatiques et donc une meilleure maîtrise de la maladie.

IV.3. <u>Différences de compositions chimiques en fonction de l'état sain ou infecté</u> <u>des plants, déterminé par analyses qPCR</u>

La méthode de traitement des données développée en IV.2, a été utilisée pour comparer les compositions chimiques en fonction du caractère sain ou infecté des plants. D'après la littérature et suivant nos résultats précédents, peu de composés ont été extraits des feuilles par rapport aux inflorescences, puisque le principal site d'accumulation des terpènes volatils se trouve dans les calices des plantes [34, 116]. Les analyses discriminantes réalisées sur les feuilles saines et infectées n'étant pas valides (PLS-DA sur feuilles de *7713* non réalisée car un seul échantillon infecté ; PLS-DA sur feuilles d'*abrial*, NMC : 17,6 % et *p*-valeur : 0,821), nous nous sommes donc concentrés dans cette section sur l'étude des inflorescences issues de plantes saines et infectées.

IV.3.1. Étude sur la lavande 7713

Etant donné le faible nombre de plants infectés (cf III.3.4), les analyses discriminantes sur la variété de lavande fine *7713* n'ont pas permis de répartir les COVs stockés en fonction des plants sains et infectés (pas assez de plants infectés pour valider le modèle).

Cependant, en forçant le modèle à récupérer les potentiels composés discriminants entre les inflorescences de lavande *7713* infectées ou non, environ 20 marqueurs (VIP > 0,9) ont été mis en évidence dont 8 sont communs à ceux identifiés dans l'étude entre les niveaux d'infection 1 (plants asymptomatiques) et 3 (plants symptomatiques) : butanoate de *(E)*-2-hexen-1-ol, α -terpinéol, oxyde de *cis*-linalol (pyranoid), terpinène-4-ol, linalol, coumarine, β -caryophyllène et oxyde de linalol.

IV.3.2. Étude sur le lavandin abrial

Concernant les COVs stockés dans les inflorescences de la variété de lavandin *abrial*, une répartition significative a été observée entre les COVs des plants sains (H) de ceux des plants infectés (I) (Figure IV-15) : *P*-valeur << 0,05 et NMC faible (8,2 %). Parmi les marqueurs ayant un score VIP supérieur à 1,5 et permettant la séparation des COVs en deux groupes distincts, 5 composés sont communs à ceux identifiés lors des analyses discriminantes comparant les niveaux d'infection 1 (asymptomatique) et 2 (symptomatique) : bornéol, β -farnésène, coumarine, 7-méthoxycoumarine et acétate de lavandulyle (Figure IV-14). Trois composés sont significativement plus présents dans les inflorescences présentant des symptômes de niveau 2 et dans celles réellement infectées : bornéol (p-value : 0,0018), *(E)*- β -farnésène (0,014) et acétate de lavandulyle (0,0017). Les deux autres composés communs, coumarine et 7-méthoxycoumarine, sortent comme des potentiels marqueurs de plants sains puisqu'ils ont été extraits en plus grande quantité des inflorescences saines (p < 0,001).



Figure IV-15. PLS-DA sur les composés stockés dans les inflorescences de lavandin *abrial* suivant les états sains (noir)/infectés (rouge) des plants (A) et abondances des composés discriminants en fonction des états sain (vert)/infecté (rouge) (B) (test non paramétrique de Mann & Whitney - *p < 0,05 ; **p < 0,01; ***p < 0,001).

D'autres composés discriminants présentant des scores < 1,5 sont également communs entre les deux études (étude suivant les symptômes et étude sur le statut sain/infecté des plants). C'est le cas des isomères (Z) et (E)- β -ocimène par leur présence significative dans les inflorescences infectées mais également identifiés comme influençant la séparation des COVs entre les niveaux de symptômes 1 et 2. Inversement, le β -caryophyllène semble plus induire des différences entre les niveaux d'infections (p < 0,001) qu'entre des inflorescences saines et réellement infectées.

IV.3.3. Influence du phytoplasme sur la composition en COVs stockés

Dans le chapitre I (I.2.2), la difficulté de détection du phytoplasme dans les lavandes en raison des variations observées au cours de l'année a été évoquée [19]. De plus, étant donné que la présence de phytoplasme n'induit pas forcément la maladie (différence de virulence des souches), il serait plus intéressant de se baser sur des études de plants asymptomatique et symptomatique pour corréler les modifications chimiques des COVs stockés avec les symptômes de dépérissement.

Or, dans cette étude, la coumarine ou le β -caryophyllène, composés discriminants, ont permis de répartir les COVs en deux groupes distincts en fonction des symptômes mais également du statut sain/infecté des plants. En prenant l'exemple des COVs stockés dans la variété *abrial*, les analyses discriminantes ont permis de séparer significativement les COVs stockés dans les inflorescences selon les niveaux d'infection 1 et 2 (Figure IV-13) ainsi que selon les états sains/infectés des plantes (Figure IV-15). Certains composés plus présents dans des plants symptomatiques au dépérissement ont été retrouvés significativement sur-exprimés dans les plantes infectées par le phytoplasme : bornéol, *(E)*- β -farnésène et acétate de lavandulyle. Pour les COVs stockés dans le lavandin *abrial*, les modifications chimiques impliquées entre les niveaux d'infection (niveaux 2 et 3) déterminés visuellement semblent représentatives de celles ayant réellement lieu lors de l'infection par le phytoplasme. Même si les résultats qPCR ne semblent pas toujours fiables pour déterminer si un plant présente ou non la bactérie pathogène, la comparaison des COVs stockés dans les plants supposés infectés ou sains apportent des résultats intéressants sur les modifications chimiques potentiellement liées à la présence du phytoplasme.

IV.4. Bilan et perspectives sur les COVs stockés

IV.4.1. Étude en fonction des années

Des échantillonnages des parties aériennes sur quatre variétés différentes (lavandins *abrial* et *grosso*, lavandes 7713 et *maillette*) ont été réalisés en champ durant les étés 2016, 2017 et 2018. A ce jour, tous les échantillons ont été lyophilisés mais seuls les échantillons 2017 ont été broyés. Il serait intéressant de réaliser une étude sur la variabilité en fonction des années, suivre l'évolution des marqueurs de plants symptomatiques et asymptomatiques mais également de caractériser la sensibilité/tolérance en fonction des COVs stockés dans les différentes variétés. Pour ce type d'étude, broyage et analyses comprises, en suivant ce qui a été fait au préalable, il faudrait au moins 3 mois d'expériences si toutes les expériences se suivent. En effet, en tenant compte de tous les échantillonnages réalisés sur les 4 variétés en 3 années, cela reviendrait à étudier 600 échantillons, à les broyer et les analyses en GC-MS (environ 38 jours d'analyses).

IV.4.2. Étude des isomères caractéristiques : linalol, acétate de linalyle et farnésène

Dans notre étude, il a été choisi de se concentrer sur les isomères caractéristiques de la lavande qui sont les énantiomères de linalol et d'acétate de linalyle. Nous nous sommes également intéressés aux diastéréoisomères de farnésène, composé identifié comme impliqué dans la séparation de plants sains et infectés lors du programme ECHoStol (I.2.4.3). L'étude de ces ratios isomériques n'a cependant pas pu être approfondie par manque de temps. En effet, le principal problème rencontré lors de cette étude métabolomique sur les COVs stockés était la durée longue autant pour la préparation des échantillons (broyage, séchage) que pour les analyses en GC-MS. Il serait néanmoins intéressant de mieux caractériser les différences isomériques au sein des extraits de COVs stockés et de visualiser des possibles différences entre plants de lavande asymptomatique/symptomatique.

Pour séparer ces isomères caractéristiques d'échantillons volatils de lavande, une phase stationnaire chirale est généralement nécessaire pour pouvoir les séparer. De nombreuses phases stationnaires sont basées sur l'utilisation d'oligosaccharides tels que la cyclodextrine. Dans le domaine des arômes et parfums, les dérivés de cyclodextrines sont souvent utilisés, principalement la β -cyclodextrine, pour leur large gamme d'application et leur grande sélectivité [292]. Comme pour les phases stationnaires achirales, il existe plusieurs types de colonnes avec différentes combinaisons de cyclodextrines.

Suivant la disponibilité des colonnes au laboratoire, il a été choisi d'analyser les isomères à l'aide d'une colonne Lipodex E composée d'octakis ((3-O-butyryl-2,6-di-O-pentyl)-y-cyclodextrin). Cette phase est considérée comme polyvalente pour séparer une large gamme de COVs [94].

Deux échantillons d'extraits hexaniques de fleurs de lavandin *abrial*, l'un sain et l'autre infecté, ont été injecté sur une méthode adaptée pour séparer les différents isomères du farnésène (Annexe 13). D'après les profils chromatographiques présentés en Figure IV-16, l'extrait de fleurs d'*abrial* infectées semble moins riche en isomères de farnésène que celui réalisé avec des fleurs asymptomatiques. Des variations de ratios isomériques du farnésène peuvent être observées en fonction des symtômes. D'après l'étude sur les marqueurs chimiques impliqués entre les plants asymptomatique et symptomatique, le (*E*)- β -farnésène semblait sur-exprimé dans les plantes symptomatiques, ce qui ne semble pas être le cas ici. L'injection d'autres réplicats est à prévoir pour approfondir ces premiers essais.



Figure IV-16. Chromatogramme des composés détectés par GC-FID (colonne chirale Lipodex E) dans les extraits hexaniques de fleurs de lavandin *abrial* symptomatique ou asymptomatique.

Des essais ont également été réalisés à partir d'HE de lavande dans le but de séparer les énantiomères de linalol et d'acétate de linalyle que ce soit en injection liquide ou après extraction en espace de tête par HS-SPME (Annexe 14). L'objectif est de pouvoir injecter des extraits hexaniques et comparer des variations qualitatives et/ou quantitatives des isomères détectés dans les échantillons. Là encore, la durée des analyses est le principal frein à l'étude puisque chaque analyse sur colonne chirale Lipodex E dure plus de 80 min.

IV.4.3. Bilan

L'optimisation de toutes les étapes impliquées dans une étude métabolomique est nécessaire pour avoir des estimations plus représentatives des compositions chimiques réellement présentes dans les parties aériennes des végétaux de manière générale. En effet, dans le cadre de la compréhension du dépérissement de la lavande, maladie causée par l'infection par le phytoplasme, il est nécessaire de caractériser l'influence qu'a la bactérie sur le métabolisme des plantes infectées. Ce chapitre sur l'étude des COVs stockés par des plantes asymptomatiques et symptomatiques ainsi que des plantes saines et infectées a mis en évidence des marqueurs chimiques potentiels de l'état symptomatique des plants.

Finalement, en étudiant les COVs stockés, il est possible de visualiser des signatures chimiques différentes en fonction de l'état symptomatique et asymptomatique. Dans cette étude, les compositions en COVs des feuilles ou inflorescences de lavande fine 7713 et lavandin *abrial* sont significativement distinctes entre les plants asymptomatiques et symptomatiques. Certains composés sont significativement plus présents dans les inflorescences symptomatiques : le butanoate de (*E*)-2-hexenyl, l' α -terpinéol, le β -sesquiphéllandrène, et le butanoate de (*Z*)-3-hexenyl (lavande fine 7713) ; le bornéol, le (*E*)- β -farnésène, l'isovalérate de linalyle, l'acétate de lavandulyle, et le β -caryophyllène (lavandin *abrial*). Le bornéol et le (E)- β -farnésène ont été également significativement sur-exprimés dans les plants de lavandin *abrial* infectés (réponse positive en qPCR).

Pour conclure et appuyer ces résultats, l'étude métabolomique optimisée et développée sur une série de 240 échantillons de feuilles et inflorescences de lavande et de lavandin récoltés en 2017 peut être appliquée sur un plus grand nombre d'échantillons en fonction des années ou sur un plus grand nombre de variétés, et les extraits peuvent être analysés qualitativement avec un détecteur MS ainsi que quantitativement à l'aide d'un détecteur FID. De plus, l'étude des ratios isomériques serait intéressante à approfondir pour voir si l'infection au phytoplasme influence sur les isomères présents dans les différents échantillons. Par ailleurs, on peut se demander s'il existe un lien entre les COVs stockés, dans les feuilles ou les inflorescences, et identifiés comme biomarqueurs, avec ceux provenant des émissions des parties aériennes.

IV.5. Comparaison des COVs émis et stockés en 2017

Il est intéressant de constater qu'entre les COVs émis et les COVs stockés de lavande fine et lavandin, des comportements similaires de surexpression ont été observés mais également des similitudes entre les espèces étudiées. Le Tableau IV-3 ci-après regroupe les composés discriminants présentant des différences d'abondances significatives ou non entre les plants asymptomatiques et symptomatiques des variétés étudiées en 2017 (lavandin *abrial* et lavande *7713*) que ce soit pour les composés émis (E) ou stockés dans les feuilles (F) ou dans les inflorescences (I).

IV.5.1. COVs émis vs. COVs stockés

La comparaison de marqueurs potentiels de plants symptomatiques, met en évidence neuf composés qui possèdent des similarités de surexpression entre les COVs émis et les COVs stockés dans les inflorescences : quatre monoterpènes (l'acétate de linalyle, les (*Z*)- et (*E*)- β - ocimène ainsi que le linalol), quatre sesquiterpènes (le *trans*- α -bergamotène, le (*E*)- β -farnésène, le germacrène D ainsi que le β -caryophyllène) ainsi que l'actétate de lavandulyle. De plus, l'acétate d'hexyle est plus émis et plus présents dans les feuilles de plants symptomatiques.

De la même manière, quatre composés présentent des comportements similaires entre les COVs émis et les COVs présents dans les inflorescences des plants asymptomatiques : 1,8-cinéole, terpinène-4-ol, linalol et β -caryophyllène. La coumarine et la 7-méthoxycoumarine, sont quant à elles présentes de façon préférentielle dans les inflorescences et feuilles des plants asymptomatiques mais n'ont pas été détectées parmis les composés émis.

Cependant, parmi tous ces composés, le linalol et le β -caryophyllène ont été surexprimés par les plants symptomatiques dans le cas du lavandin *abrial* alors qu'ils semblent être des marqueurs de plants asymptomatiques dans les études sur la lavande fine *7713*. Il y a donc des différences de comportements en fonction des deux espèces.

Au sein des marqueurs identifiés lors de l'étude comparative entre plants asymptomatiques et symptomatiques réalisée en 2017 sur les plants de lavandin fine *7713* et de lavandin *abrial*, quatorze composés avaient déjà été identifiés comme marqueurs potentiels lors du projet ECHoStol^[a]. Néanmoins, seuls six marqueurs communs au programme précédent présentent des comportements similaires à ceux obtenus en 2017 : allo-ocimène, 1,8-cinéole, terpinène-4-ol, linalol, β -myrcène et β -caryophyllène dont quatre n'ont des tendances d'abondances similaires que dans le cas du lavandin *abrial* (terpinène-4-ol, linalol, β -myrcène et β -caryophyllène). Le 1,8-cinéole est un potentiel marqueur de plant asymptomatique, alors que les autres composés ont été sur-exprimés par les plantes symptomatiques. Tableau IV-3. Composés discriminants présentant des différences d'abondances significatives (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,001) ou non entre les plants asymptomatiques et les plants symptomatiques en 2017. Les marqueurs ont été identifiés à partir de l'étude sur les COVs émis en champ (E : émissions) ou sur les COVs stockés (I : inflorescences, F : feuilles) (+ : composé plus abondant ; ^[a]identifié en tant que marqueur dans le programme ECHoStol).

	Lavande 7713						Lavandin <i>abrial</i>					
	Asym	ptoma	tique	Symptomatique		Asymptomatique			Symptomatique			
Nolecule discriminante	émis	sto	ckés	émis	st	ockés	émis	sto	ckés	émis	sto	ckés
	E	I	F	E	T	F	E	1	F	E	1	F
Monoterpenes												1
acetate de linalyle ^(a)				+	+	ماد ماد ماد ماد					ale ale ale	
borneol ^[a]						+****		at at			+***	
hydrate de camphène								+**				
allo-ocimène ^{laj}				+						+		
1,8-cinéole ^[a]	+						+	+				+****
limonène ^[a]	+											
linalol ^[a]	+	+								+	+*	
oxyde de linalool					+							
oxyde de <i>cis</i> -linalol		+									+	
(pyranoïde)												
β-myrcène ^[a]	+										+**	
(E)-β-ocimène ^[a]										+	+**	
(Z)-β-ocimène ^[a]				+						+	+**	
β-pinène								+		+		
terpinolène										+		
terpinène-4-ol ^[a]	+	+									+*	
α-terninéol		+**						+				-
Sesquiterpènes												
trans-α-bergamotène										+	+	
δ-cadinène											+	
γ-cadinène ^[a]								+*				
α -caryophyllène					+			+				
β-carvophyllène ^[a]	+	+								+	+	
oxyde de caryophyllène					+							
(F)-B-farnésène ^[a]				+*						+	+**	-
germacrène D										+	+	
isovalérate de linalyle				-							' _*	
		*									- -	
p-sesquiprienanurene											'	
Coumarines												
coumarine		+	+**					+***				
7-méthoxycoumarine								+***	+ ***			
Autres												
acétate d'hexule				+*						+		+ ***
acétate de (7) 2 hoven 1 el				-			-			-		-
acetate de 2 actoral	*						-					
aceidie de lavandulula ^[2]	Ŧ			.*							.***	
	. * *			+*						+	+***	
butanoate de (E)-2-hexenyl	+**											
butanoate de (Z)-2-hexenyl	+											

IV.5.2. Lavande fine 7713 vs. lavandin abrial

En comparant les deux expèces étudiées, dix composés présentent des comportements similaires que ce soit par la surexpression dans les plants symptomatiques (six COVs) ou dans les plants asymptomatiques (quatre COVs). Les émissions d'allo-ocimène, de (*Z*)- β -ocimène, de (*E*)- β -farnésène, d'acétate d'hexyle et d'acétate de lavandulyle, plus importantes par les plants symptomatiques, ont des comportements similaires entre la lavande fine et le lavandin. Le bornéol est également significativement plus présent dans les feuilles de plants symptomatiques de lavandin fine *7713* et les inflorescences symptomatiques de lavandin *abrial*. Inversemment, le 1,8-cinéole semble plus émis par les plants asymptomatiques des deux espèces et l' α -terpinéol ainsi que la coumarine sont présents en plus grande abondance dans les inflorescences au sein des plants asymptomatiques des deux espèces.

IV.5.3. Perception des composés par la cicadelle

Pour se faire une idée de la détection des composés par l'insecte, les marqueurs identifiés peuvent être comparés à la seule étude publiée faisant référence à la perception des COVs par *H. obsoletus* [32]. Cette étude de Riolo *et al.* (2012) qui présente les résultats d'expériences de chromatographie en phase gazeuse couplée à de l'électro-antennographie (EAD) a été menée sur de l'ortie et du gattilier et non sur de la lavande. Cette technique d'électrophysiologie consiste à vérifier si un composé est perçu par un insecte. L'antenne de l'insecte est reliée à 2 électrodes, à chaque fois qu'une molécule est perçue, un signal électrique est détecté au niveau des électrodes. Il a été montré que le β -caryophyllène, l' α et β -farnésène et le linalol induisaient une réponse antennaire chez *H. obsoletus* quel que soit la plante hôte (ortie ou gattilier) et quel que soit le sexe de l'insecte [32].

Une étude GC-EAD réalisée au CEFE, dans le cadre du stage de Elisa Chatelard (Master 2) et dans le cadre du projet EUCLIDE, a permis de déterminer quels sont les COVs, issus du bouquet de COVs de lavandin *grosso*, détectés par la cicadelle [266]. En plus du β -caryophyllène, du β -farnésène et du linalol, six autres composés, détectés comme marqueurs dans notre étude, ont été perçus par l'insecte : bornéol, α -bergamotène, α -terpinéol, 1,8-cinéole, germacrène D et acétate de linalyle.

En parallèle, des tests de choix en cage ont été réalisés au sein du CRIEPPAM pour tester l'attirance ou la répulsion des COVs pour *H. obsoletus* en visualisant la répartition des insectes entre deux plantes dont l'une contient un diffuseur et l'autre non. Deux diffuseurs différents émettant soit le β -farnésène, soit le β -caryophyllène ont été testés. Les résultats préliminaires des tests comportementaux utilisant le β -farnésène indiquent que les insectes sont significativement plus présents sur la plante présentant le diffuseur de β -farnésène (molécule attractive). Alors qu'à l'inverse, dans les tests avec le β -caryophyllène, les résultats montrent une tendance répulsive de la molécule. Ces tendances sont à confirmer par d'autres tests mais également à l'échelle d'une parcelle.

Chapitre V.

Apport d'un système de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse portable

Chapitre basé sur la publication :

STIERLIN É., MICHEL T, FERNANDEZ X. Field analyses of lavender volatile organic compounds: performance evaluation of a portable gas chromatography-mass spectrometry device. *Phytochemical Analysis*, 2020. doi: 10.1002/pca.2942.



V.1. <u>Contexte</u>

V.1.1. Intérêts des analyses sur le terrain

Pour identifier des changements dans les émissions de COVs rapidement sur le terrain, combiner les étapes de piégeage et d'analyse des COVs présente un défi (Figure V-1). De nouvelles technologies applicables en écologie chimique sont développées dans le but d'améliorer la compréhension des interactions plantes-insectes [293].



Figure V-1. Méthodes permettant de diagnostiquer de façon non destructive une plante infectée par un pathogène en étudiant le bouquet de COVs (figure extraite de [294]). CLSA: closed-loop-strippinganalysis, système d'extraction dynamique en circuit fermé qui consiste à piéger les COVs entraînés par un gaz inerte sur un piège adsorbant. MCC: Multi-capillary-column, colonne multicapillaire. ST: silicone tubing, tubes en silicone.

Il existe une diversité de techniques actuellement disponibles pour piéger et analyser les COVs impliquées dans la défense des plantes (sections I.6 et I.7). A ce jour, les méthodes de collecte des COVs émis en espace de tête sont principalement de deux types (section I.6.2) : passives ou dynamiques. Cependant, la plupart de ces outils nécessitent des appareillages uniquement appropriés pour des études en laboratoire. Les interactions chimiques impliquées dans les processus de défense des plantes sont des processus dynamiques qui évoluent continuellement. La réalisation d'extractions et d'analyses rapides et directement sur le terrain peut apporter de nombreux avantages dans la compréhension de problèmes écologiques en temps réel :

- Anticiper une infection ou une maladie par simple détection de modification du bouquet de COVs,
- Etudier l'évolution des émissions en COVs à la suite d'un stress,
- Obtenir des résultats rapides (gain de temps),
- Eviter le délai entre l'échantillonnage et l'analyse,
- Diminuer le coût des échantillonnages (réutilisation des fibres SPME par exemple).

L'objectif est de mettre en place un ou plusieurs appareil(s) avec une bonne résolution, sensibilité et spécificité pour une application ciblée.

Dans notre étude sur dépérissement de la lavande, l'utilisation d'un appareil combinant l'extraction et l'analyse sur le terrain aurait permis de voir directement les profils chromatographiques sur le terrain et ainsi pouvoir proposer rapidement une solution d'amélioration de piégeage ou d'analyse des prélèvements réalisées en 2018.

La méthode de PTR-MS a été utilisée pour étudier les COVs impliqués dans les interactions plantes-insectes [244]. En comparant les masses des ions produits et détectés par PTR-MS à celles obtenues lors d'analyses en GC-MS, il a pu être mis en évidence que, qu'après l'alimentation des racines d'*Arabidopsis* par des pathogènes (*Diuraphis noxia*), les racines blessées ont libéré du 1,8-cinéole (155 uma, unité de masse atomique, et détection des fragments 81 uma et 137 uma). Comme cela a été évoqué dans la section 1.6.2.3, les principaux inconvénients de cette technique employée seule sont la non-distinction des COVs de même masse moléculaire, la difficulté d'analyse de mélanges complexes et le manque d'informations sur les composés semi-volatils en raison de la méthode d'échantillonnage utilisée [295]. L'outil de PTR-MS est plus approprié pour la détection de composés volatils de faible masse moléculaire tels que l'éthanol, le méthanol et le propanol [294].

D'autre part, le nez électronique (E-nose) a été proposé comme nouvelle technologie pour déterminer rapidement les COVs émis [293, 296, 297]. Le dispositif d'E-nose se compose d'un réseau de capteurs présentant des sensibilités différentes aux molécules appartenant à plusieurs classes chimiques ou ayant des groupes fonctionnels différents. Un nez électronique a notamment été utilisé pour analyser la production de phéromones chez les pucerons [298]. Des échantillons d'air ont été prélevés sur des pucerons et des larves d'acariens placés dans des flacons. L'aiguille de l'E-nose a été insérée à travers le septum du flacon en verre et un flux d'air entrant a été généré par une seringue adjacente à l'aiguille de l'E-nose. Des prélèvements de 20 s ont été réalisés toutes les 2 min avec un débit de 30 mL/min, aspirant un total de 10 mL d'air à travers le nez électronique pendant 20 s. En combinant ces prélèvements par nez électronique à des analyses par GC-MS, la libération de (E)- β -farnésène par les pucerons à la suite d'une attaque d'acariens a pu être mesurée au cours du temps. Après une forte augmentation au départ, l'émission du composé a diminué de façon exponentielle. Ainsi, l'E-nose est un outil facile à utiliser, rapide et utile pour repérer des

différences d'émissions en COVs ainsi que détecter des plantes malades. Cependant, ce dispositif n'est pas assez sélectif et ne permet pas l'identification et la quantification de tous les COVs d'un mélange (nombre limité de capteurs et banques de données faibles) [299].

C'est pourquoi, le développement d'instruments de laboratoire miniaturisés transportables permettant de réaliser des mesures rapides sur le terrain est en émergence [300]. Le développement de méthodes applicables sur le terrain propose de nouvelles approches pour analyser les COVs en écologie chimique. Ainsi, la combinaison de ces capteurs d'odeur aux appareils de GC-MS portables apporterait notamment une analyse plus fiable et rapide sur le terrain pour comprendre les interactions chimiques impliquées entre plantes-insectes par exemple (Figure V-1).

V.1.2. Appareils portables et objectifs de l'étude

Les progrès des différents systèmes portables disponibles actuellement sur le marché, utilisés en laboratoire ou transportables sur le terrain, ont été détaillés dans l'étude de Snyder, *et al.* (2017) [300]. Les systèmes portables possèdent en général un analyseur ainsi qu'une source d'ionisation regroupée dans un compartiment rigide, portable et fonctionnant sur batterie (capacité > 1 h).

La plupart de ces appareils portables ne sont pas composés d'une technique de séparation des molécules. C'est le cas, par exemple, du spectromètre de masse transportable Mini 10, de faible poids (10 kg) développé par l'université de Purdue (West Lafayette, Etat-Unis) et apportant une bonne reproductibilité de résultats. Il a permis de quantifier la mélamine, additif dans le lait pouvant entraîner des problèmes endocriniens [301]. Or, la plupart de ces spectromètres de masse sont conçus pour la détection d'explosifs ou d'armes chimiques. La société Flir Systems a mis en place des spectromètres de masse imposants (de 22,7 à 36,5 kg), pas toujours transportables, pour réaliser des analyses dans le domaine militaire. Toujours pour le même type d'application, la compagnie coréenne Sam Yang a commercialisé un spectromètre de masse portatif de très faible poids (1,48 kg) mais nécessitant une recharge fréquente.

Finalement, seuls quatre appareils de GC-MS portables utilisables sur le terrain et présentés dans le Tableau V-1 semblent être commercialisés à ce jour. L'utilisation du Tridion-9 commercialisé par Torion Technologies (acheté en 2015 par PerkinElmer) a notamment été évaluée sur des plantes de *Centaurea solstitialis* [302]. Par ACP, les émissions des plantes ayant subies un stress se regroupent en un groupe distinct des émissions provenant de plantes stressées. Le cyclosativène, le copaène, le 1-pentadécène, l' α -pinène ainsi qu'un sesquiterpène inconnu ont été émis en plus grande quantité par les plants attaqués comparés aux plants non attaqués.

Tableau V-1. Avantages et inconvénients de différent	s dispositifs de GC-MS	portables (d'après [300]).
--	------------------------	----------------------------

Fournisseur	Inficon	Torion Technologies	Torion Technologies	PerkinFlmer	
		(PerkinElmer)	(PerkinElmer)		
Modèle					
Nom	HAPSITE	Guardion-7	Tridion-9	Torion T9	
Date de	1998	2008	2013	2015	
commercialisation					
Mode d'ionisation	Ionisation électronique	Ionisation électronique	Ionisation électronique	Ionisation électronique	
Colonne	Rtx-1MS	MXT-5	MXT-5	MXT-5	
colonne	(15 m x 0,25 mm x 1 μm)	(5 m x 0,1 mm x 0,4 μm)	(5 m x 0,1 mm x 0,4 μm)	(5 m x 0,1 mm x 0,4 μm)	
Poids	19 kg	14,5 kg	14,5 kg	14,5 kg	
Dimensions	46 x 43 x 18 cm	47 x 36 x 18 cm	38,1 x 39,4 x 22,9 cm	19,8 x 31,8 x 27,4 cm	
Avantages		Poids faible (< 15 kg)	Poids faible (< 15 kg)	Poids faible (< 15 kg)	
Avantages	-	Robuste	Robuste	Robuste	
Inconvénients	Pas de concentration des composés avant l'analyse	Trappe ionique (peu de bibliothèques)	Trappe ionique (peu de bibliothèques)	Trappe ionique (peu de bibliothèques)	
MS: mass spectromet	er				

TMS: miniature toroidal ion trap mass spectrometer
D'autre part, Aksenov *et al.* (2014) ont combiné un appareil de GC portable avec un spectromètre de mobilité différentielle (DMS) dont le principe repose sur un champ électrique attirant les ions issus de la chambre d'ionisation à travers un canal de filtre jusqu'à la détection. L'objectif était de détecter et séparer par études statistiques les plants atteint de la maladie du verdissement des agrumes causée par la bactérie *Candidatus* Liberibacter, bactérie transmise par un psylle, des autres plants non infectés [303]. L'appareil portable GC/DMS a été plus rapide et moins coûteux que la méthode qPCR habituellement utilisée pour la détection de la bactérie pathogène. De plus, les bactéries sont réparties de manière inégale dans les tissus des végétaux et leur présence varient en fonction du temps ce qui a conduit à caractériser par qPCR certains plants comme non infectés alors qu'ils l'étaient en réalité. Par ces études, l'utilisation de GC-MS portables est considérée comme rapide et fiable dans l'identification de COVs sur le terrain.

Dans le cadre de notre projet nous avons eu l'opportunité de collaborer avec la société PerkinElmer pour évaluer les performances et l'intérêt du système GC-MS portable Torion détaillé en Figure V-2. Des analyses ont été réalisées en mai 2018 aux jardins du Musée International de la Parfumerie (Mouans-Sartoux) à l'aide de ce système de chromatographie en phase gazeuse portable à faible masse thermique, et couplé à un petit spectromètre de masse de type piège à ions toroïdal (ppGC-ITMS). Ce système de 14,5 kg est robuste pour des applications sur le terrain (19,8 cm x 31,8 cm x 27,4 cm), fonctionne avec une batterie rechargeable (jusqu'à 2,5 h d'autonomie) et de petites bouteilles d'hélium (généralement 100-150 analyses par bouteille). Les COVs sont piégés et concentrés sur une fibre SPME ou dans une aiguille (NT: needle-trap), contenant plusieurs adsorbants, et reliée à une pompe puis injectés dans l'appareil de GC-MS pour l'analyse.



Figure V-2. Schématisation du système de chromatographie en phase gazeuse portable (ppGC-ITMS) (d'après PerkinElmer).

L'objectif de notre étude est d'évaluer le potentiel de l'appareillage ppGC-ITMS pour analyser les COVs de lavande et lavandin sur le terrain ainsi que d'évaluer l'apport de ce dispositif dans une étude métabolomique réalisée sur les émissions de deux espèces : lavande *diva* et lavandin *grosso-ADA*.

V.2. <u>Apport d'un appareil de GC-MS portable dans l'analyse des COVs de</u> lavande et lavandin

Published in Phytochemical Analysis (2020, doi: 10.1002/pca.2942)

Field analyses of lavender volatile organic compounds: performance evaluation of a portable gas chromatography-mass spectrometry device

Émilie Stierlin, Thomas Michel, Xavier Fernandez Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice UMR 7272, 06108 Nice, France

Emilie Stierlin: Emilie.STIERLIN@univ-cotedazur.fr Thomas Michel: Thomas.MICHEL@univ-cotedazur.fr Xavier Fernandez: Xavier.FERNANDEZ@univ-cotedazur.fr

*Corresponding author. Tel.: +33 4 92 07 64 69; fax: +33 4 92 07 65 17 E-mail address: Xavier.FERNANDEZ@univ-cotedazur.fr

Abstract

Introduction: *In situ* analysis of volatile organic compounds (VOCs) emitted by plants is an important challenge in chemical ecology. The traditional approach usually consists in trapping compounds using dynamic headspace extraction (DHS) in-field, followed by gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GC–MS and/or GC-FID) in the laboratory.

Objectives: In this study, we evaluate the use of the new portable TORION T-9 GC-MS system for rapid and *in situ* analysis of VOCs emitted by fine lavender and lavandin species.

Material and methods: All field analyses were performed using a person-portable lowthermal mass GC system coupled with a miniature toroidal ion trap mass analyser (ppGC-ITMS): Torion T-9 portable GC–MS. Subsequently, multivariate statistical analyses were performed to determine chemical differences between species.

Results: Thirty compounds were separated and detected from all lavender aerial part samples in only 3 min of analysis.

Conclusions: The portable GC–MS device enabled a rapid in-field distinction of *Lavandula* species based on their detected volatile profiles.

KEYWORDS

chemical ecology; lavender; portable gas chromatography; volatile organic compounds.

1 INTRODUCTION

Plants produce and emit volatile organic compounds (VOCs) which play a number of biotic roles, such as acting as cues between plants and other organisms (herbivores, pathogens,

pollinators, parasitoids and plants) [39, 304]. Their emission is often affected by biotic as well as abiotic factors (e.g. UV strength, ozone content, droughts or elevated temperatures). Given their role in plant survival and their environmental adaptations, VOCs are of major interest in chemical ecology [169]. The study of VOCs could allow for the detection of disease or pathogen infection, followed by the proposal of an adapted solution to such attacks on plants [190]. The characterisation of these molecules in the field, where they are often involved in complex chemical interactions, is a challenge for scientists [144]. In chemical ecology the collection of compounds is typically performed using one of two main headspace methods: the use of gas syringes or bags of inert material (e.g. tedlar or nalophan) to collect a volume of air, or the use of traps (adsorbent or absorbent phases) to concentrate VOCs [44, 144, 189]. Then, collected compounds are transferred to the laboratory and VOCs are analysed using gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry (GC–MS) or gas chromatography with flame ionisation detection (GC-FID) [144]. However, these analytical methods use a lengthy manner to analyse all samples. In addition, due to the delay between sampling and analysis, VOCs trapped in-field may be lost and degraded, causing results not representative of the emissions produced under natural conditions. Usually, proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) is used to measure VOC emissions directly in the field [295]. However, the separation of several compounds of the same molecular weight, such as monoterpenes, is not possible using this method. In order to study in situ VOC emissions, several types of portable GC–MS devices, presented as fast and reliable, have been developed [295, 296, 302, 305, 306]. One such portable GC–MS device was been developed and used by Sharma et al. to study the response of plants (Asclepias syriaca) to aphid attacks, specifically to distinguish between infested and non-infested plants [296]. However, this non-commercial device has not yet been field-tested. Perkin-Elmer has developed a commercial, totally self-contained new personportable GC–MS device (Torion T-9) consisting of a low-thermal mass GC system and a miniature toroidal ion trap analyser [305].

In our study, we focused on the VOC emissions of fine lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula × intermedia*), emblematic plants of Provence (southeast France) cultivated for their essential oils rich in monoterpenes and sesquiterpenes [4].

A previous study recently published by our group used a dynamic headspace (DHS) device to trap VOCs emitted by different varieties of lavender in the field. Volatile compounds were then analysed in the laboratory using an automated thermal desorption (ATD)-GC–MS [291]. A total of 50 compounds were identified in lavender and lavandin. Although effective, this analytical strategy is time-consuming (1 h of field extraction, 15 min of thermodesorption and 113 min of analysis) and requires a delay between in-field sampling and benchtop analysis. The use of a device combining both steps (i.e. compound extraction and chromatographic analysis) would provide chemical profiles in the field immediately following extraction.

The objectives of our study were to (1) evaluate the potential of the portable Torion T-9 GC– MS device to analyse VOCs emitted by lavender and lavandin in the field, and to (2) evaluate the utility of this device in a metabolomic study in chemical ecology.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Plant Material

Sampling was carried out in May 2018 in the MIP Gardens (MIP: Musée International de la Parfumerie) in Mouans-Sartoux, France (latitude 43.614218 and longitude 6.977749). For this field study, two different types of lavender were chosen: *diva* fine lavender (*Lavandula angustifolia*), and *grosso-ADA* lavandin (*Lavandula × intermedia*). This allowed us to determine if the device used to extract and analyse VOCs was sensitive enough to separate the emissions of two distinct species. For each extraction, the above-ground parts of 15 lavender plants were enclosed in polyethylene terephthalate (nalophan) bags (Etablissements Charles frères, Saint-Etienne, France), creating a headspace around flowers (Figure V-3).



Figure V-3. Application in the MIP's Gardens (Mouans-Sartoux, France) by needle trap extraction on lavender (A), and a view of the Torion T-9 GC/MS in lavender fields (B).

2.2 Headspace extraction

All experiments were performed on diva fine lavender above-ground parts. Passive headspace solid phase microextraction (HS-SPME) were performed using a CUSTODION[®] SPME syringe (Perkin Elmer Torion Technologies, American Fork, UT, USA) with a

divinylbenzene/polydimethylsiloxane (DVB/PDMS; 65 μ m) stationary phase [307]; while dynamic headspace needle trap extraction (HS-NT) was carried out on a CUSTODION® NT (Perkin Elmer Torion Technologies) composed of three adsorption phases (1 mg, 60–80 mesh Tenax TA/1.6 mg, 60–80 mesh Carboxen 1016/1.5 mg, 60–80 mesh Carboxen 1003) [308]. The NT device was connected to a ClairionTM air sampling pump at a constant flow rate of 50 mL/min for plant extractions [309]. Before using the devices for the first time, SPME and NT were conditioned according to the manufacturer's instructions. Blank runs were performed before each extraction. The influence of extraction time was tested at six different times (0.5, 1, 5, 10, 20 and 30 min) for both SPME and NT devices.

2.3 ppGC-ITMS system for VOCs analyses

All field analyses were performed using a person-portable low-thermal mass GC system coupled with a miniature toroidal ion trap mass analyser (ppGC-ITMS): Torion[®] T-9 portable GC–MS device (Perkin Elmer Torion Technologies). Figure V-3 (B) shows the system used infield for this study. This 14.5 kg system has a robust design for field use [19.8 cm (height) × 31.8 cm (width) × 27.4 cm (depth)], operates with a rechargeable battery (up to 2.5-h lifetime) and small helium cylinders (typically 100–150 analyses per cylinder).

A MXT-5 low thermal mass capillary column (Crossbond diphenyl dimethyl polysiloxane, 5 m \times 0.1 mm \times 0.4 µm, Restek, Bellefonte, PA, USA) was used with helium as the carrier gas (constant flow rate of 0.4 mL/min). Desorption was performed for 10 s, and injections were carried out in split mode (10:1 split for 10 s followed by 50:1 split flow for 20 s) with the injector set to a temperature of 270°C [306]. The oven temperature was initially held at 40°C (or 50°C before optimisation) for 10 s and then increased from 40°C (or 50°C) to 270°C (2°C/s) and finally held at 270°C for 50 s (or 60 s). The electronic ionisation mode of the toroidal ion trap mass analyser (ITMS) was set to 70 eV with a mass scan range of 43 to 400 atomic mass units (a.m.u.). The total run time was 185 s.

2.4 Data treatment

Data acquisition was performed using CHROMION 1.1 software (Perkin Elmer Torion Technologies). All data were directly obtained in net.CDF format on a removable SD flash card and then analysed using the Chemstation software (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

2.5 Identification of compounds

The identification of compounds was carried out by comparing the mass spectra with those recorded by internal or commercial mass-spectral libraries (NIST and Wiley) as well as by comparing the linear retention indexes (LRIs) with those found in the literature (NIST). All identifications correspond to putatively identified compounds (level 2) because no standards were used in this study. Retention indexes (RIs) were calculated using a formula described by Van den Dool and Kratz [188], as well as according to the retention times of a standard n-alkane C7-C24 mixture. The alkane mixture, diluted to 0.1% in dichloromethane, was analysed using HS-SPME GC–MS according to the method described previously.

2.6 Statistical analysis

Data alignment was performed using the metaMS.runGC function of Workflow 4 Metabolomics (W4M) to obtain a matrix with the samples in rows, the retention times in columns and the relative areas of the compounds in each sample [183, 240].

All other statistical analyses were performed using the R software (R Foundation, Institute for Statistics and Mathematics, Vienna, Austria). In order to identify differences in VOC emissions between varieties, PLSDA (partial least square-discriminant analyses) were performed using the *plsda* function of the mixOmics R package, after data normalization [179]. Only compounds with a VIP (variable importance in projection) score higher than 1.5 were selected (package RVAideMemoire).

Normality and homoscedasticity of the data were tested using the Shapiro and Levene tests, respectively. For non-parametric compounds, Mann–Whitney tests were performed. The *multtest.gp* function of the RVAideMemoire package was used to give corrected p-values for each metabolite. The statistical significance level was fixed to 0.05.

3 RESULTS AND DISCUSSION

According to the results obtained, as well as to the literature [296], the study was carried out using dynamic extraction by NT for 5 min to extract the most compounds emitted by lavender above-ground parts (Annexe 15 and Annexe 16). Considering the short time analysis, not exceeding 5 min, the extraction time also needed to be as fast as possible in order to make the most use of the analysis system.

3.1 Evaluation of ppGC-ITMS to characterize VOCs emitted by plants in fields

The chromatographic profile obtained using HS-NT GC–MS on diva lavender is presented in Figure V-4 and the relative abundances of VOCs emitted by the two varieties are detailed in Table V-2. A total of 31 compounds were integrated during ppGC-ITMS analysis of *diva* and *grosso-ADA* emission. Among these, only one compound remains unidentified, representing $0.2 \pm 0.3\%$ (*diva*) and 0.1% (*grosso-ADA*) of the total GC area. The structures of the identified compounds are shown in Figure V-5.

However, tests with the portable GC–MS device show that separation quality varies according to the small column used and the temperature conditions applied. The rapid increase in temperature of the portable GC–MS device leads to co-elutions of monoterpenes and sesquiterpenes (Figure V-4).



Figure V-4. The total ion chromatogram (TIC) of compounds detected by NT-ppGC-ITMS analysis on above-ground parts of *diva* fine lavender. The numbers correspond to the compounds detailed in Table V-2 and GLVs to Green leaf volatiles.

The weak chromatographic resolution observed in profiles obtained using the portable low thermal GC system may be due to this rapid temperature programme (from 40 to 270°C in 3 min) and the short length of the column (5 m). According to the specifications, we decided to carry out an analysis in less than 5 min, in order to save time. In addition, having a gradient of oven temperature results in higher resolution. In essential oils analysis, RIs calculated using alkane standards and comparison to RI databases confirmed compound identification. Mass spectra from portable GC–MS devices, obtained using a miniature toroidal type analyser, could be different from those obtained using quadrupole type analysers used to create reference libraries [306]. The identification of compounds detected by this portable device, which depends upon database mass spectra and LRIs, is therefore less reliable (Table V-2).

It is nevertheless possible to identify compounds in only 3 min, despite obtaining little differences between small retention times and small peak widths, both of which decrease resolution. Even if the separation capacity is not optimal, 30 compounds (Figure V-5) were identified by ppGC-ITMS in 3 min, providing a rapid analysis of lavender VOCs directly in the field. The main VOCs emitted by *diva* above-ground parts were 1,8-cineole (**7**) (25.2 ± 2.8%), β -phellandrene (**6**) (20.1 ± 6.2%) and linally acetate (**20**) (13.4 ± 3.8%) whereas the main compounds in the *grosso-ADA* variety were: γ -terpinene (**10**) (37.7 ± 11.3%), camphor (**16**) (20 ± 2.1%) and (*E*)- β -ocimene (**9**) (18.8 ± 2.2%).

N°	Compound	RI	RI (lit.)	Area (% ± SD) ^[a]			Corrected
		(calc.)		diva	grosso-ADA	v IP score	p-value
1	. 1	774	775	0 () 1 7			
1	toluene	//4	//5	2.6 ± 1.7	-	-	-
2	(E)-2-hexenal	802	815	0.4	0.2	-	-
3	(Z)-3-hexen-1-ol ^[0]	865	854	0.8	0.2	-	-
4	camphene	963	960	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.7	-	-
5	3-carene	1010	1011	1.0 ± 0.8	0.6 ± 0.2	-	-
6	β-phellandrene	1029	1029	20.1 ± 6.2	0.9 ± 0.4	1.5443	6.17*10-4
7	1,8-cineole ^[b]	1046	1044	25.2 ± 2.8	-	-	-
8	(Z) - β -ocimene ^[b]	1052	1040	tr.	11.1 ± 3.2	-	-
9	(E) - β -ocimene ^[b]	1061	1052	-	18.8 ± 2.2	-	-
10	γ-terpinene ^[b]	1066	1066	-	37.7 ± 11.3	1.6641	5.18*10-8
11	cis-sabinene	1075	1073	tr.	0.5 ± 0.2	-	-
12	cis-linalool oxide	1088	1087	1.8 ± 0.6	-	1.6604	2.51*10-9
13	terpinolene ^[b]	1100	1090	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	-	-
14	allo-ocimene ^[b]	1126	1127	tr.	0.5	-	-
15	cis-limonene oxide (A) +	1141	1107	6.5 ± 1.7	2.5 ± 1.3	-	-
	linalool (B) ^[b]						
16	camphor ^[b]	1170	1161	1.5 ± 0.7	20 ± 2.1	1.6644	0.07
17	borneol	1184	1177	5.1 ± 2.4	15.3 ± 0.5	-	-
18	<i>p</i> -cymen-8-ol	1198	1189	2.6 ± 0.9	0.3 ± 0.1	-	-
19	fenchyl acetate	1257	1226	9.9 ± 3.3	-	-	-
20	linalyl acetate ^[b]	1260	1261	13.4 ± 3.8	0.7 ± 0.4	-	-
21	bornyl acetate ^[b]	1301	1305	1.1 ± 0.6	0.3 ± 0.1	-	-
22	neryl acetate ^[b]	1384	1381	0.9 ± 0.3	0.2	-	-
23	β-bourbonene	1415	1417	0.4 ± 0.2	-	-	-
24	α -guaiene	1436	1438	-	0.2	1.6632	2.51*10-9
25	α -santalene ^[b]	1437	1424	4.1 ± 0.5	-	-	-
26	β -carvophyllene ^[b]	1457	1446	tr.	0.2	-	-
27	α-carvophyllene	1477	1483	tr.	tr.	-	-
28	germacrene D ^[b]	1490	1480	0.5 ± 0.2	0.1	-	-
29	v-muurolene	1522	1502	tr.	-	-	-
30	2-ethylhexyl salicylate	1822	1817	1.6 ± 0.9	0.4 ± 0.2	-	-

^[a]area expressed as a percentage of the Total Ion Chromatogram (TIC).

^[b]reported in conventional field analyses on lavender [18].

tr. (trace compounds) refer to compound detected with relative percentages < 0.1%.

RI (calc.), Retention Index calculated according to the retention times of standard n-alkane C7-C24 mixture.

RI (lit.), Retention Index reported in the literature (NIST, ESO).

-, absent. NI, not identified.

SD, standard deviation.



Figure V-5. Chemical structures of the thirty compounds detected by NT-ppGC-ITMS in three minutes of analysis on above-ground parts of *diva* fine lavender and *grosso-ADA* lavandin. The numbers correspond to the compounds detailed in Table V-2.

To date, very few studies have been performed on in-field lavender VOC emissions [72]. According to An et al. (2001), 31 compounds were trapped by SPME (PDMS fibre) used on fine lavender from the field [72]. Linalool and linalyl acetate were identified as major compounds, but β -phellandrene and 1,8-cineole were not detected, contrary to our results on *diva* fine lavender. Recently, volatile compounds produced by fine lavender and lavandin were collected in-field using the DHS approach [291]. Compounds trapped were further thermodesorbed and analysed in the laboratory with an ATD-GC-MS device. In addition to the long extraction time (1 h by DHS), the laboratory analysis is very time-consuming: 15 min of thermodesorption and almost 2 h for the analysis method. With the portable GC–MS device, in only 3 min, 31 compounds were identified for *diva* fine lavender and *grosso-ADA* lavandin. Considering an extraction time of 5 min and an analysis time of 3 min, five extractions and analyses can be performed per hour in the field. However, only 14 of the 50 compounds identified by Stierlin et al. (2020) [291] using conventional analyses were detected (Table V-2). Differences, particularly in linalool/linalyl acetate ratios, were also observed between the profiles obtained using the NT device combined with the Torion T-9 portable GC–MS device and those obtained via DHS followed by analysis using a benchtop instrument [291]. These ratio changes may partly result from co-elution between linalool and cis-limonene oxide in the portable GC–MS device. The weak chromatographic resolution observed with the portable low thermal GC system may be due to the rapid temperature programme (from 40 to 270°C in 3 min) and the short length of the column (5 m). Furthermore, the use of splitless mode to inject all sample and better visualize separated compounds must be further explored.

3.2 Evaluation of ppGC-ITMS to compare VOCs emitted by aerial parts of two different species

To evaluate the performance of the TORION[®] T-9 portable GC-MS to quickly characterise differences between two plant species, multivariate analysis were performed (Figure V-6).

To evaluate the contribution of each variable to the model, VIP scores were calculated. Five compounds obtained a VIP score > 1.5 (Figure V-7): three of them were only detected in the above-ground parts of *grosso* lavandin (camphor (**16**), γ -terpinene (**10**), α -guaiene (**24**)), and *cis*-linalool oxide (**12**) was only emitted by *diva* lavender (Table V-2).

Interestingly, in a metabolomic study comparing the emissions of different lavender and lavendin roots in the laboratory, β -phellandrene was shown to be involved in the discrimination between lavender (*maillette*, 7713) and lavandin (*grosso, abrial*) root species [310]. In our study, β -phellandrene (**6**) has also been identified as marker more emitted by the above-ground parts of lavender.



Figure V-6. Partial least squares-discriminate analysis (PLS-DA) score plot of compounds emitted by *diva* lavender (left) and *grosso* lavandin (right) above-ground parts.



Figure V-7. Changes in the relative abundance (%) of the five main discriminant compounds derived from PLS-DA realized on floral bouquet emitted by the varieties (var): *diva* fine lavender or *grosso* lavandin (***p < 0.001).

We have shown that data from the Torion[®] T-9 portable GC–MS device can be used in a metabolomic study. Thus, this device makes it possible to conduct field sampling and to combine the first two steps of a metabolomic study which are, extraction and chromatographic separation [311]. In our study, despite the environmental constraints such as abiotic and biotic stresses, chemical diversity of compounds emitted by plants or variability between biological samples, the portable device allowed to distinguish two different species (fine lavender and lavandin) based on their VOCs emission. Compounds allowing discrimination between diva fine lavender and grosso lavandin may be involved in the yellow decline disease, such as camphor, already identified in previous work dealing with this disease.[34].

4 CONCLUSIONS: ASSESSMENT OF THE CONTRIBUTION OF A PORTABLE GC-MS DEVICE

Rapid in situ characterisation of VOC emitted by two lavender species was for the first time developed using ppGC-ITMS. The portable GC–MS provides a short sampling time (5 min) and fast chromatographic separation (3 min), which are real benefits when working in the field compared to conventional DHS GC–MS method. In addition, spectroscopic data obtained from ppGC-ITMS can be used in metabolomic approach. Herein, two different species (fine lavender and lavandin) were distinguish based on their VOCs emission. Therefore, this new ppGC-ITMS system is of interest for chemical ecology studies which aim to detect slight changes in plant VOC emissions depending on abiotic or biotic factors.

However, separation and detection of all the plant volatiles, especially monoterpenes, were not achievable. This weak resolution is due, in part, to the short column length and the rapid temperature increase programmed. As already indicated by Sharma *et al.* [296], to reduce coelutions and improve the device, it would be interesting to make this portable system as powerful as a laboratory GC–MS unit by increasing the length of the column or modifying the type of stationary phase according to the compounds studied. Generation of compound database for the miniature toroidal ITMS would be an interesting option to improve compound identification. Also, it would be worthwhile to combine, the use of a portable GC–MS device with other techniques, such as PTR-MS device or an E-nose, to provide additional information on the concentrations of specific emitted compounds over time [295, 296, 312].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Perkin-Elmer for the loan of the TORION[®] T-9 portable GC-MS and the MIP Gardens for access to their lavender fields.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

V.3. <u>Avantages/inconvénients du TORION T-9 GC-MS</u>

Contrairement aux méthodes d'analyse habituellement effectuées, le ppGC-ITMS, testé dans l'étude décrite en section V.2, présente deux avantages majeurs :

- Des analyses rapides (3 min),
- Une utilisation simple et pratique sur le terrain.

Néanmmoins, à la suite de l'étude que nous avons réalisée pendant une semaine, un certain nombre d'inconvénients sont apparus :

- la faible résolution des profils chromatographiques obtenus. Les mauvaises séparations des composés peuvent être dues en partie à la petite colonne employée (MXT-5, 5 m x 0,1 mm x 0,4 μm) ainsi qu'au choix de gradient de température utilisé dans le but d'avoir une analyse courte (augmentation rapide de la température). Ici, une optimisation au préalable de la méthode analytique (gradient, mode d'injection) aurait certainement permis de mieux séparer les COVs de lavande et lavandin.
- l'utilisation d'un analyseur de type trappe ionique qui nécessite moins de vide, ce qui rend les identifications plus difficiles lors des comparaisons aux spectres de masse et indices de rétention des banques de données généralement obtenues à partir d'analyses avec un analyseur de type quadrupole et en ionisation électronique.
- l'injection manuelle adaptée uniquement à l'extraction statique de type SPME ou dynamique par NT, ce qui limite le choix du mode d'extraction et empêche la réalisation d'extractions successives automatiques.
- le fonctionnement sur batterie possible que durant 2 à 3 heures avant rechargement sur secteur électrique (30 minutes de chargement). Il est possible de remplacer la batterie quand l'appareil est branché, mais si ce n'est pas le cas, il est nécessaire d'éteindre tout le dispositif ce qui peut être gênant si des analyses sont en cours.
- le poids de 14,5 kg sans les accessoires, ce qui peut vite devenir encombrant suivant le lieu d'échantillonnage.
- le coût de l'appareil.

Tous les paramètres n'ont pas pu être optimisés. Il aurait fallu par exemple optimiser la méthode analytique (gradient, mode d'injection) pour mieux séparer les COVs de lavande et lavandin. Le TORION T-9 GC-MS portable apporte toutefois de nombreuses pistes d'utilisation en écologie chimique ainsi que dans le cadre d'étude métabolomique. Associé à des méthodes d'extraction de COVs, il pourrait permettre de suivre *in situ* l'évolution des émissions de COVs pour chaque plante et détecter des changements dans les émissions de COVs en fonction de facteurs abiotiques ou biotiques [294]. Sharma *et al.* (2019) ont développé un appareil de GC portable qui a permis de départager les émissions en COVs entre des plants d'*Asclepias syriaca* infectés de pucerons (*Aphis nerii*) et des plants non infectés [296]. Ce type de dispositif n'est pas en compétition avec les méthodes d'extraction et d'analyse actuellement utilisées en écologie chimique, comme la méthode DHS GC-MS, mais fournit des résultats complémentaires grâce à son analyse rapide des COVs. D'autres études sont encore nécessaires pour mieux comprendre son apport dans un problème écologique.

Conclusion/Perspectives

Le but de ces travaux de thèse était de développer des méthodes analytiques et métabolomiques pour identifier les composés organiques volatils (COVs) de la lavande (*Lavandula angustifolia* Miller) et du lavandin (*Lavandula x intermedia*) dans le contexte du dépérissement.

La première partie de ces travaux a consisté à **développer une méthode HS-SPME GC-MS pour piéger et analyser les composés émis par les racines en laboratoire et** *in situ* (Chapitre II). C'est la première fois qu'une telle étude a été réalisée sur les COVs de racines de lavande et de lavandin. La méthode a été développée et optimisée en laboratoire dans le but d'extraire et caractériser les COVs de racines broyées et intactes. Ainsi, la phase adsorbante (fibre SPME composée de DVB/CAR/PDMS), le temps d'extraction (60 minutes) et la température d'extraction (70°C) ont été optimisés. Cette méthode appliquée tout d'abord sur des racines de lavandin *grosso* a permis la détection de 99 COVs, dont 40 monoterpénoïdes, 15 sesquiterpénoïdes, 1 diterpénoïde et 2 coumarines. Les trois composés majoritairement extraits par ces racines en laboratoire sont le fenchol, le bornéol et la coumarine.

Dans le cadre du dépérissement, il est intéressant d'étudier les racines de lavande car les larves de la cicadelle se développent pendant plusieurs mois dans le sol en se nourrissant des racines. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, les émissions en COVs de six variétés différentes de racines de lavande fine et lavandin ont été étudiées afin de déterminer si une signature chimique commune existe entre les variétés sensibles (lavande 7713 et lavandin abrial) et les variétés tolérantes (lavandes diva et maillette ainsi que lavandins grosso et supian). Même si le caractère sensible/tolérant des plants n'est, à ce jour, pas défini avec précision [24], les analyses discriminantes réalisées sur les COVs émis par les échantillons des parties racinaires ont permis de départager les échantillons en deux groupes significativement distincts suivant leur caractère de sensibilité. Les coumarines sont potentiellement des marqueurs de la tolérance des plants. Cependant, ces composés sont connus comme étant surexprimé lors d'un stress telle qu'une coupure. Il est donc probable que leurs aires relatives soient faussées en raison des coupures lors de la préparation des échantillons. Un seul composé, la pipéritone, était significativement plus émis par des racines sensibles. D'autres composés, non significatifs semblent également plus émis par les plants sensibles. C'est le cas par exemple de l'épi-cadinol, du benzaldéhyde, de l'alcool benzylique, du thymol, du phénol, trans-sabinène hydrate ou encore du bornéol. Ces expériences en laboratoire ont apporté une caractérisation des COVs émis par les racines de différentes variétés de lavande et lavandin et des résultats prometteurs sur la différenciation d'émissions racinaires entre elles.

Cette diversité chimique observée en laboratoire n'est pas forcément représentative des émissions racinaires dans leur environnement naturel. Une stratégie d'étude des COVs émis par les racines en plein champ en pot a donc été évaluée à l'aide d'un dispositif conçu en pot. Après une extraction d'une durée de 4h sur les racines de lavandin *grosso* dans le sol, 31

composés ont été identifiés, avec comme composés majoritairement émis la fenchone, le fenchol, le 1,8-cinéole et le camphre. Cependant, les résultats obtenus avec la fibre DVB/CAR/PDMS sont moins reproductibles et semblent moins sensibles que les analyses en laboratoire. En perspective de ce travail, il serait intéressant d'approfondir ces études sur le terrain afin d'améliorer le dispositif de piégeage et développer une méthode sensible et rapide permettant d'identifier des marqueurs chimiques pouvant départager des émissions entre plants sensibles/tolérants ou symptomatiques/asymptomatiques au dépérissement.

Le deuxième objectif de la thèse était d'appliquer une méthode de DHS ATD-GC-MS permettant de piéger et d'analyser les COVs émis par les plantes dans leur environnement naturel (Chapitre III). Afin de choisir les méthodes de piégeage et d'analyse les plus adaptées à notre étude, un cahier des charges détaillant les contraintes d'étude de COVs dans un milieu environnant complexe a été élaboré. Une telle étude sur le terrain nécessite de réaliser de nombreuses extractions sur une période restreinte de temps tout en ne perturbant pas le modèle vivant et en obtenant une bonne sensibilité, répétabilité et reproductibilité de détection des molécules. Pour répondre au mieux à ces critères, un dispositif d'extraction en espace de tête six voies portatif a été appliqué sur le plateau de Sault en 2017 et 2018. Les COVs émis par les parties aériennes sur le terrain ont été piégés à l'aide d'un piège Tenax choisi pour sa large gamme de piégeage. Ils ont ensuite été analysés en laboratoire par ATD-GC-MS avec séparation des composés sur une colonne ELITE-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) et un gradient de température large allant de 35 à 270°C. Les résultats ont montré une variabilité de la signature chimique des COVs émis de lavande fine et de lavandin en fonction de l'état asymptomatique ou symptomatique des plants lors de la campagne d'échantillonnage de 2017. L'acétate de lavandulyle et le (E)-β-farnésène paraissent être des marqueurs d'infection puisqu'ils semblent plus émis par les plants de lavandin abrial symptomatiques et indiqués positifs après qPCR en 2017. D'autre part, le 1,8-cinéole semble plus émis par les plants asymptomatiques que ce soit par le lavandin abrial en 2017 et par la lavande fine 7713 en 2018. Ce composé est un potentiel marqueur de plants sains. Il serait donc judicieux de réaliser une nouvelle campagne d'échantillonnage de COVs sur les mêmes parcelles de lavande et lavandin, avec les mêmes conditions de piégeages employées en 2017, pour confirmer les distinctions entre plants asymptomatiques/symptomatiques. De plus, il serait intéressant de pouvoir confirmer ces résultats en comparant des plants sains et des plants dont l'infection par le phytoplasme est confirmée et l'unique facteur du dépérissement. En effet, les nombreux stress auxquels le modèle biologique est exposé sur le terrain rendent l'exploitation et la compréhension des résultats statistiques complexes. De plus, l'incertitude sur l'état d'infection des plants est également un facteur limitant à l'étude. Ces contraintes d'études en plein champ remettent en question l'intérêt du développement d'un élevage de cicadelles ainsi que le contrôle de l'infection des plantes afin de travailler en mésocosme sur des plants sains et réellement infectés.

Dans une troisième partie, une étude métabolomique basée sur la méthodologie UAE GC-MS a été optimisée pour extraire et analyser les COVs stockés dans les feuilles et les inflorescences de lavande et lavandin (Chapitre IV). Des échantillons de feuilles et d'inflorescences ont été collectés sur le terrain, puis congelés, lyophilisés et broyés avant extraction. Il a été choisi d'extraire les COVs présents dans les plantes par extraction assistée aux ultrasons (UAE) pendant 30 minutes à l'aide du *n*-hexane (50 mg/mL), de centrifuger les extraits et de récupérer le surnageant pour les analyses en GC-MS. Un total de 56 composés a pu être détecté en GC-MS à l'aide d'une séparation sur colonne apolaire HP-1 (50 m x 0,2 mm x 0,33 µm) et d'un gradient de température allant de 40 à 220°C (2°C/min).

Des échantillons de lavande 7713 et lavandin *abrial* récoltés en 2017 ont été étudiés dans le but de comparer les compositions chimiques en fonction de l'état symptomatique des plants. Après analyses discriminantes, des différences significatives entre les COVs stockés par les plantes symptomatiques et asymptomatiques au dépérissement ont été observées. Certains composés sont significativement plus présents dans les inflorescences symptomatiques : butanoate de (*E*)-2-hexenyl, α -terpinéol, β -sesquiphellandrène, et butanoate de (*Z*)-3-hexenyl (lavande fine 7713) ; bornéol, (*E*)- β -farnésène, isovalérate de linalyle, acétate de lavandulyl, et β -caryophyllène (lavandin *abrial*). Le bornéol et le (*E*)- β -farnésène ont été également significativement sur-exprimés dans les plants de lavandin *abrial* ayant eu une réponse positive en qPCR.

Suite à l'étude comparative des données obtenues en 2017 entre les COVs émis et les COVs stockés des parties aériennes, dans les deux cas, une répartition des échantillons en deux groupes distincts asymptomatique/symptomatique a pu être mis en évidence. Plusieurs marqueurs communs (COVs émis et stockés) ont pu être dégagés : l'acétate de linalyle, le bornéol, l' α -bergamotène, le β -farnésène ainsi que le germacrène D sont des marqueurs de plants symptomatiques alors que le 1,8-cinéole et l' α -terpinéol sont des marqueurs de plants asymptomatiques. Néanmoins, des incohérences en fonction des espèces étudiées ont été obtenues pour le linalol ainsi que le β -caryophyllène. Ces résultats sont à approfondir dans l'objectif de distinguer des plants en fonction de leurs symptômes mais également de leur tolérance au dépérissement.

Le dernier chapitre de cette thèse a permis d'évaluer les performances d'un nouvel appareil de GC-MS portable commercialisé par PerkinElmer sur les COVs émis par les parties aériennes de lavande et lavandin sur le terrain (Chapitre V). Ainsi, pour aller plus loin et identifier des changements d'émissions rapidement sur le terrain en écologie, associer les étapes de piégeage et d'analyse des COVs présente un défi. Le TORION T-9 GC-MS a permis de réaliser des analyses rapides (3 min) et une utilisation simple et pratique sur le terrain. Il présente néanmoins des limites par la faible résolution des profils chromatographiques obtenus, l'identification difficile des composés, l'injection manuelle des échantillons mais également sa durée d'utilisation inférieure à 3h sur batterie, son poids encombrant ainsi que son coût élevé. Associé aux méthodes d'extraction et d'analyse actuellement utilisées en

écologie chimique, cet appareil portable apporte toutefois de nombreuses pistes d'utilisation dans ce domaine ainsi que dans le cadre d'étude métabolomique. Ainsi, l'emploi de nouvelles technologies telles que le TORION T-9 GC-MS ou le nez électronique, permettrait d'anticiper une infection par simple détection de modification du bouquet de COVs, de suivre l'évolution des émissions en COVs à la suite d'un stress, de gagner du temps dans l'obtention des résultats, d'éviter le délai entre l'échantillonnage sur le terrain et l'analyse en laboratoire ainsi que de diminuer le coût des échantillonnages.

D'autres développements analytiques en laboratoire peuvent être proposés par GC bidimensionnelle, qui consiste à coupler deux séparations chromatographiques de nature différente (par exemple, colonne apolaire x colonne chirale), dans le but notamment de couvrir une plus large gamme de COVs et également pour étudier les ratios isomériques, évoqués dans ce manuscrit de thèse, que ce soit en fonction de la sensibilité/tolérance des plants mais également en fonction du statut asymptomatique/symptomatique.

Pour conclure, ce travail de thèse propose de nouvelles approches d'extraction et de caractérisation des COVs en écologie chimique et apporte de meilleures connaissances sur les composés pouvant être impliqués dans le dépérissement de la lavande.



Références bibliographiques

- 1. World checklist of selected plant families: Royal Botanic Gardens, Kew. (s. d.).
- 2. Stevens, P. F. (2017, juillet). Angiosperm Phylogeny Website, Version 14. *Angiosperm Phylogeny Website*.
- Moja, S., Guitton, Y., Nicolè, F., Legendre, L., Pasquier, B., Upson, T., & Jullien, F. (2016). Genome size and plastid trnK-matK markers give new insights into the evolutionary history of the genus *Lavandula* L. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing* with all Aspects of Plant Biology, 150(6), 1216-1224.
- 4. Aprotosoaie, A. C., Gille, E., Trifan, A., Luca, V. S., & Miron, A. (2017). Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry. *Phytochemistry Reviews*.
- 5. Koulivand, P. H., Khaleghi Ghadiri, M., & Gorji, A. (2013). Lavender and the nervous system. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*, 1-10.
- 6. Lis-Balchin, M. (2002). *Lavender: The Genus Lavandula*. Taylor & Francis.
- 7. Guignard, J.-L., & Dupont, F. (2015). *Botanique: les familles de plantes* (Elsevier Masson.).
- 8. Grand, P. (2009, mai 18). Lavandula angustifolia *Mill. et son huile essentielle* (thesis). Université de Nantes.
- 9. Despinasse, Y. (2015). *Diversité chimique et caractérisation de l'impact du stress hydrique chez les lavandes* (thèse en Biologie végétale). Université des Sciences et Techniques de Saint-Etienne, Saint-Etienne.
- 10. Stanev, S., Zagorcheva, T., & Atanassov, I. (2016). Lavender cultivation in Bulgaria 21st century developments, breeding challenges and opportunities. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *22*(4), 584-590.
- 11. Chailan, C. (2013). Production et marchés des huiles essentielles de lavandes et lavandins. *Les synthèses de FranceAgriMer / Plantes à parfum, aromatiques et médicinales*, (1).
- 12. Giray, F. H. (2018). An analysis of world lavender oil markets and lessons for Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *21*(6), 1612-1623.
- Chaisse, E., Fontaine, M., Costes, T., Taquin, S., Vial, G., Perrot, S., & Bringer-Guerin, C. (2017, octobre). Le bulletin technique et économique de la filière plantes à parfum. L'Essentiel, (90).
- Vrandečić, K., Ćosić, J., Jurković, D., Stanković, I., Vučurović, A., Krstić, B., & Bulajić, A. (2014). First report of Septoria leaf spot of lavandin caused by *Septoria lavandulae* in Croatia. *Plant Disease*, *98*(2), 282-282.
- 15. Nakova, M. (2011). Phytosanitary monitoring of lavender diseases. *Agricultural sciences*, *III*(5), 5-10.
- 16. Marcone, C., Bellardi, M. G., & Bertaccini, A. (2016). Phytoplasma diseases of medicinal and aromatic plants. *Journal of Plant Pathology*, *98*(3).
- 17. Blancard, D. (2017, août 21). Biologie, épidémiologie (http://ephytia.inra.fr/fr/C/5237/Tomate-Biologie-epidemiologie). Ephytia.

- 18. Fabre, A., Danet, J.-L., & Foissac, X. (2011). The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene*, 472(1-2), 37-41.
- Sémétey, O., Gaudin, J., Danet, J.-L., Salar, P., Theil, S., Fontaine, M., Krausz, M., Chaisse, E., Eveillard, S., Verdin, E., & Foissac, X. (2018). Lavender decline in France is associated with chronic infection by Lavender-specific strains of *"Candidatus* Phytoplasma solani". *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(24), 1-16.
- 20. Bertaccini, A., & Duduk, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*, 355-378.
- 21. Bertamini, M., & Nedunchezhian, N. (2001). Effects of phytoplasma [Stolbur-Subgroup (Bois Noir-BN)] on photosynthetic pigments, saccharides, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, nitrate and nitrite reductases, and photosynthetic activities in field-grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay) leaves. *Photosynthetica*, 39(1), 119-122.
- Kessler, S., Schaerer, S., Delabays, N., Turlings, T. C. J., Trivellone, V., & Kehrli, P. (2011). Host plant preferences of *Hyalesthes obsoletus*, the vector of the grapevine yellows disease 'bois noir', in Switzerland: Host plant preferences of *Hyalesthes obsoletus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 139(1), 60-67.
- 23. Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M., & Schulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *17*(11), 1175-1184.
- Gaudin, J., Semetey, O., Foissac, X., & Eveillard, S. (2011). Phytoplasma titer in diseased lavender is not correlated to lavender tolerance to stolbur phytoplasma. In *Bulletin of Insectology* (Vol. 64, p. S179–S180). Department of Agroenvironmental Sciences and Technologies.
- 25. Kumari, S., Nagendran, K., Rai, A. B., Singh, B., Rao, G. P., & Bertaccini, A. (2019). Global status of phytoplasma diseases in vegetable crops. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1349.
- 26. Candaele, B., Taquin, S., Fraty, D., Coët, J., Gommé, A., & Bringer-Guerin, C. (2019, avril). Le bulletin technique et économique de la filière plantes à parfum. *L'Essentiel*, (96).
- 27. Weintraub, P. G., & Jones, P. (Éd.). (2010). *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Cambridge, MA: CABI North American Office.
- 28. Gregg, P. C., Del Socorro, A. P., & Landolt, P. J. (2018). Advances in Attract-and-Kill for Agricultural Pests: Beyond Pheromones. *Annual Review of Entomology*, *63*(1), 453-470.
- 29. Suckling, D. M. (2000). Issues affecting the use of pheromones and other semiochemicals in orchards. *Crop Protection*, *19*(8-10), 677-683.
- 30. Mazzoni, V., Lucchi, A., Ioriatti, C., Virant-Doberlet, M., & Anfora, G. (2010). Mating behavior of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *103*(5), 813-822.
- 31. Mazzoni, V., Lucchi, A., Čokl, A., Prešern, J., & Virant-Doberlet, M. (2009). Disruption of the reproductive behaviour of *Scaphoideus titanus* by playback of vibrational signals. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 133(2), 174-185.

- Riolo, P., Minuz, R. L., Anfora, G., Stacconi, M. V. R., Carlin, S., Isidoro, N., & Romani, R. (2012). Perception of host plant volatiles in *Hyalesthes obsoletus*: behavior, morphology, and electrophysiology. *Journal of Chemical Ecology*, *38*(8), 1017-1030.
- 33. Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, *10*(6), 269-274.
- 34. Yvin, C., Cansière, R., Chuche, J., Thierry, D., Nicolè, F., Kuntzmann, P., Delavaud, M., & Gallois, P. (2018). Étude des facteurs sensoriels intervenant dans le choix de plantes et dans le comportement alimentaire des adultes de *Hyalesthes obsoletus* (Echostol). *Innovations Agronomiques*, (63), 445-456.
- 35. Khan, Z. R., James, D. G., Midega, C. A. O., & Pickett, J. A. (2008). Chemical ecology and conservation biological control. *Biological Control*, *45*(2), 210-224.
- 36. Fiehn, O., Kloska, S., & Altmann, T. (2001). Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Current Opinion in Biotechnology*, *12*, 82-86.
- 37. Germinet, R., & Le Cloirec, P. (1998). *Les composés organiques volatils (COV) dans l'environnement* (Lavoisier-Tec & Doc.). Paris: Lavoisier-Tec & Doc.
- Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 237-243.
- 39. Iijima, Y. (2014). Recent advances in the application of metabolomics to studies of Biogenic Volatile Organic Compounds (BVOC) produced by plant. *Metabolites*, *4*(3), 699-721.
- 40. Peñuelas, J., & Staudt, M. (2010). BVOCs and global change. *Trends in Plant Science*, *15*(3), 133-144.
- 41. Bustos-Segura, C., & Foley, W. J. (2018). Foliar terpene chemotypes and herbivory determine variation in plant volatile emissions. *Journal of Chemical Ecology*, *44*(1), 51-61.
- 42. Dicke, M., & Baldwin, I. T. (2010). The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science*, *15*(3), 167-175.
- Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R. C., & Audenaert, K. (2018). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New Phytologist*, *220*(3), 666-683.
- 44. Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *25*(5), 417-440.
- 45. Peñuelas, J., & Llusià, J. (2001). The complexity of factors driving volatile organic compound emissions by plants. *Biologia Plantarum*, *44*(4), 481-487.
- 46. Gouinguené, S. P., & Turlings, T. C. J. (2002). The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology*, *129*(3), 1296-1307.
- 47. Sharkey, T. D., Wiberley, A. E., & Donohue, A. R. (2007). Isoprene emission from plants: why and how. *Annals of Botany*, *101*(1), 5-18.

- 48. Loreto, F., Mannozzi, M., Maris, C., Nascetti, P., Ferranti, F., & Pasqualini, S. (2001). Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology*, *126*(3), 993-1000.
- 49. Graus, M., Schnitzler, J.-P., Hansel, A., Cojocariu, C., Rennenberg, H., Wisthaler, A., & Kreuzwieser, J. (2004). Transient release of oxygenated volatile organic compounds during light-dark transitions in grey poplar leaves. *Plant Physiology*, *135*(4), 1967-1975.
- 50. Hoballah, M. E., Stuurman, J., Turlings, T. C. J., Guerin, P. M., Connétable, S., & Kuhlemeier, C. (2005). The composition and timing of flower odour emission by wild *Petunia axillaris* coincide with the antennal perception and nocturnal activity of the pollinator *Manduca sexta*. *Planta*, *222*(1), 141-150.
- 51. Scala, A., Allmann, S., Mirabella, R., Haring, M., & Schuurink, R. (2013). Green Leaf Volatiles: A Plant's Multifunctional Weapon against Herbivores and Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(9), 17781-17811.
- 52. Ruther, J., & Mayer, C. J. (2005). Response of garden chafer, *Phyllopertha horticola*, to plant volatiles: from screening to application. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *115*(1), 51-59.
- 53. Hildebrand, D. F., Brown, G. C., Jackson, D. M., & Hamilton-Kemp, T. R. (1993). Effects of some leaf-emitted volatile compounds on aphid population increase. *Journal of Chemical Ecology*, *19*(9), 1875-1887.
- Pinto-Zevallos, D. M., Hellén, H., Hakola, H., van Nouhuys, S., & Holopainen, J. K. (2013). Induced defenses of *Veronica spicata*: Variability in herbivore-induced volatile organic compounds. *Phytochemistry Letters*, 6(4), 653-656.
- 55. Bruin, J., Dicke, M., & Sabelis, M. W. (1992). Plants are better protected against spidermites after exposure to volatiles from infested conspecifics. *Experientia*, *48*(5), 525-529.
- 56. Schiestl, F. P., Kirk, H., Bigler, L., Cozzolino, S., & Desurmont, G. A. (2014). Herbivory and floral signaling: phenotypic plasticity and tradeoffs between reproduction and indirect defense. *New Phytologist*, *203*(1), 257-266.
- 57. Rasmann, S., Köllner, T. G., Degenhardt, J., Hiltpold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenzon, J., & Turlings, T. C. J. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*, *434*(7034), 732-737.
- 58. Jassbi, A. R., Zamanizadehnajari, S., & Baldwin, I. T. (2010). Phytotoxic volatiles in the roots and shoots of *Artemisia tridentata* as detected by Headspace Solid-phase Microextraction and Gas Chromatographic-Mass Spectrometry analysis. *Journal of Chemical Ecology*, *36*(12), 1398-1407.
- 59. Effah, E., Holopainen, J. K., & McCormick, A. C. (2019). Potential roles of volatile organic compounds in plant competition. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *38*, 58-63.
- 60. Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. Weinheim: WILEY-VCH.
- 61. Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie: phytochimie et plantes médicinales*. Cachan: Lavoisier.

- 62. Abbas, F., Ke, Y., Yu, R., Yue, Y., Amanullah, S., Jahangir, M. M., & Fan, Y. (2017). Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. *Planta*, *246*, 803-816.
- 63. Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, *198*(1), 16-32.
- 64. Maffei, M. E., Gertsch, J., & Appendino, G. (2011). Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Natural Product Reports*, *28*(8), 1359.
- 65. Muhlemann, J. K., Klempien, A., & Dudareva, N. (2014). Floral volatiles: from biosynthesis to function. *Plant, Cell & Environment, 37*(8), 1936-1949.
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and analysis of terpenes/terpenoids. In G. Stacey, J. Birchler, J. Ecker, C. R. Martin, M. Stitt, & J.-M. Zhou (Éd.), *Current Protocols in Plant Biology* (p. 345-358). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- 67. Guitton, Y. (2010, décembre 21). *Diversité des composés terpéniques volatils au sein du genre Lavandula : aspects évolutifs et physiologiques* (thesis). Université Jean Monnet Saint-Etienne.
- Chizzola, R. (2013). Regular monoterpenes and sesquiterpenes (Essential Oils). In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Éd.), *Natural Products* (p. 2973-3008). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 69. Dudareva, N. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology*, *135*(4), 1893-1902.
- 70. Demissie, Z. A., Erland, L. A. E., Rheault, M. R., & Mahmoud, S. S. (2013). The biosynthetic origin of irregular monoterpenes in *Lavandula*: isolation and biochemical characterization of a novel cis-prenyl diphosphate synthase gene, lavandulyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(9), 6333-6341.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4364-4370.
- 72. An, M., Haig, T., & Hatfield, P. (2001). On-site field sampling and analysis of fragrance from living Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) flowers by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography and ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *917*(1-2), 245-250.
- 73. Pistelli, L., Najar, B., Giovanelli, S., Lorenzini, L., Tavarini, S., & Angelini, L. G. (2017). Agronomic and phytochemical evaluation of lavandin and lavender cultivars cultivated in the Tyrrhenian area of Tuscany (Italy). *Industrial Crops and Products*, *109*, 37-44.
- Lesage-Meessen, L., Bou, M., Sigoillot, J.-C., Faulds, C. B., & Lomascolo, A. (2015). Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3375-3385.

- 75. Fakhari, A. R., Salehi, P., Heydari, R., Ebrahimi, S. N., & Haddad, P. R. (2005). Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A*, *1098*(1-2), 14-18.
- 76. Wiesenfeld, E. (1999). Note 57: Aroma profiles of *Lavandula* species.
- 77. Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2015). *Lavandula angustifolia* and *Lavandula latifolia* essential oils from Spain: Aromatic profile and bioactivities. *Planta Medica*, *82*(01/02), 163-170.
- 78. Lafhal, S., Vanloot, P., Bombarda, I., Kister, J., & Dupuy, N. (2016). Chemometric analysis of French lavender and lavandin essential oils by near infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*, *80*, 156-164.
- 79. Yassaa, N., & Williams, J. (2005). Analysis of enantiomeric and non-enantiomeric monoterpenes in plant emissions using portable dynamic air sampling/solid-phase microextraction (PDAS-SPME) and chiral gas chromatography/mass spectrometry. *Atmospheric Environment*, *39*(27), 4875-4884.
- 80. de Pascual-T, J., Caballero, E., Caballero, C., & Machin, G. (1983). Constituents of the essential oil of *Lavandula latifolia*. *Phytochemistry*, *22*(4), 1033-1034.
- Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2016). Lavandin (*Lavandula* × *intermedia* Emeric ex Loiseleur) essential oil from Spain: determination of aromatic profile by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Natural Product Research*, 30(10), 1123-1130.
- Sudria, C., Piñol, M. T., Palazon, J., Cusido, R. M., Vila, R., Morales, C., Bonfill, M., & Cañigueral, S. (1999). Influence of plant growth regulators on the growth and essential oil content of cultured *Lavandula dentata* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 177–184.
- 83. Dris, D., Tine-Djebbar, F., & Soltani, N. (2017). *Lavandula dentata* essential oils: chemical composition and larvicidal activity against *Culiseta longiareolata* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *African Entomology*, *25*(2), 387-394.
- Benabdelkader, T., Guitton, Y., Pasquier, B., Magnard, J. L., Jullien, F., Kameli, A., & Legendre, L. (2015). Functional characterization of terpene synthases and chemotypic variation in three lavender species of section Stoechas. *Physiologia Plantarum*, 153(1), 43-57.
- Sanz, J., Soria, A. C., & García-Vallejo, M. C. (2004). Analysis of volatile components of Lavandula luisieri L. by direct thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1024(1-2), 139-146.
- 86. Garcia-Vallejo, M. I., Garcia-Vallejo, M. C., Sanz, J., Bernabé, M., & Velasco-Negueruela,
 A. (1994). Necrodane (1,2,2,3,4-pentamethylcyclopentane) derivatives in *Lavandula luisieri*, new compounds to the plant kingdom. *Phytochesmistry*, *36*(1), 43-45.
- 87. Sebai, H., Selmi, S., Rtibi, K., Souli, A., Gharbi, N., & Sakly, M. (2013). Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Lipids in Health and Disease*, *12*(1), 189.

- 88. Carrasco, A., Ortiz-Ruiz, V., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2015). *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography–mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. *Industrial Crops and Products*, *73*, 16-27.
- Gonçalves, S., Serra, H., Nogueira, J. M. F., Almeida, R., Custódio, L., & Romano, A. (2008). Headspace-SPME of *in vitro* shoot-cultures and micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Biologia Plantarum*, 52(1), 133-136.
- 90. Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*(3), 274-280.
- 91. Hatanaka, A. (1993). The biogeneration of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, *34*(5), 1201-1218.
- 92. Collet, A. (2006). *Molécules chirales: stéréochimie et propriétés*. Les Ulis; Paris: EDP Sciences ; CNRS éditions.
- 93. Allmann, S., & Baldwin, I. T. (2010). Insects betray themselves in nature to predators by rapid isomerization of Green Leaf Volatiles. *Science*, *329*(5995), 1075-1078.
- 94. Ozek, T., Tabanca, N., Demirci, F., Wedge, D. E., & Can Baser, K. H. (2010). Enantiomeric distribution of some linalool containing essential oils and their biological activities. *Records of Natural Products*, *4*(4), 180-192.
- 95. Jung, J., Sewenig, S., Hener, U., & Mosandl, A. (2005). Comprehensive authenticity assessment of lavender oils using multielement/multicomponent isotope ratio mass spectrometry analysis and enantioselective multidimensional gas chromatographymass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 220(2), 232-237.
- 96. Aprotosoaie, A. C., Hăncianu, M., Costache, I.-I., & Miron, A. (2014). Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties: Linalool: a key odorant molecule. *Flavour and Fragrance Journal*, *29*(4), 193-219.
- 97. Baser, K. H. C., Özek, T., & Konakchiev, A. (2005). Enantiomeric distribution of linalool, linalyl acetate and camphor in Bulgarian lavender oil. *Journal of Essential Oil Research*, *17*(2), 135-136.
- 98. Krupčík, J., Gorovenko, R., Špánik, I., Armstrong, D. W., & Sandra, P. (2016). Enantioselective comprehensive two-dimensional gas chromatography of lavender essential oil: Gas Chromatography. *Journal of Separation Science*, *39*(24), 4765-4772.
- 99. Prince, E. K., & Pohnert, G. (2010). Searching for signals in the noise: metabolomics in chemical ecology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(1), 193-197.
- 100. Fiehn, O. (2002). Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, *48*, 155-171.
- 101. Kuhlisch, C., & Pohnert, G. (2015). Metabolomics in chemical ecology. *Natural Product Reports*, *32*(7), 937-955.
- Wolfender, J.-L., Rudaz, S., Hae Choi, Y., & Kyong Kim, H. (2013). Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. *Current Medicinal Chemistry*, 20(8), 1056-1090.

- 103. Sardans, J., Peñuelas, J., & Rivas-Ubach, A. (2011). Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*, *21*(4), 191-225.
- 104. Kaling, M., Schmidt, A., Moritz, F., Rosenkranz, M., Witting, M., Kasper, K., Janz, D., Schmitt-Kopplin, P., Schnitzler, J.-P., & Polle, A. (2018). Mycorrhiza-triggered transcriptomic and metabolomic networks impinge on herbivore fitness. *Plant Physiology*, 176(4), 2639-2656.
- 105. Ju, Y., Yue, X., Zhao, X., Zhao, H., & Fang, Y. (2018). Physiological, micro-morphological and metabolomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf of plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *130*, 501-510.
- Araniti, F., Lupini, A., Sunseri, F., & Abenavoli, M. R. (2017). Allelopatic potential of Dittrichia viscosa (L.) W. Greuter mediated by VOCs: A physiological and metabolomic approach. PLOS ONE, 12(1), e0170161.
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J. L., Granell, A., Conejero, V., & Bellés, J. M. (2017). A non-targeted metabolomics approach unravels the VOCs associated with the tomato immune response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1188.
- 108. Matsukawa, T., Asai, T., & Kajiyama, S. (2017). Metabolic changes during defense responses against wound stresses in Citrus plants. In H. Gill & H. Garg (Éd.), *Citrus Pathology*. IntechOpen.
- 109. Wei, G., Tian, P., Zhang, F., Qin, H., Miao, H., Chen, Q., Hu, Z., Cao, L., Wang, M., Gu, X., Huang, S., Chen, M., & Wang, G. (2016). Integrative analyses of nontargeted volatile profiling and transcriptome data provide molecular insight into VOC diversity in Cucumber plants (*Cucumis sativus*). *Plant Physiology*, *172*(1), 603-618.
- 110. Hijaz, F., El-Shesheny, I., & Killiny, N. (2013). Herbivory by the insect *Diaphorina citri* induces greater change in citrus plant volatile profile than does infection by the bacterium, *Candidatus* Liberibacter asiaticus. *Plant Signaling & Behavior*, *8*(10), e25677.
- 111. Catola, S., Marino, G., Emiliani, G., Huseynova, T., Musayev, M., Akparov, Z., & Maserti,
 B. E. (2016). Physiological and metabolomic analysis of *Punica granatum* (L.) under drought stress. *Planta*, 243(2), 441-449.
- 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.
- 113. Danh, L. T., Han, L. N., Triet, N. D. A., Zhao, J., Mammucari, R., & Foster, N. (2013). Comparison of chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of Lavender (*Lavandula angustifolia* L.) essential oils extracted by supercritical CO2, hexane and hydrodistillation. *Food and Bioprocess Technology*, 6(12), 3481-3489.
- 114. Ali Shafaghat. (2012). Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(3), 455-460.

- 115. Baydar, H., & Kineci, S. (2009). Scent composition of essential oil, concret, absolue and hydrosol from lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *2*, 131-136.
- 116. Guitton, Y., Nicolè, F., Moja, S., Valot, N., Legrand, S., Jullien, F., & Legendre, L. (2010). Differential accumulation of volatile terpene and terpene synthase mRNAs during lavender (*Lavandula angustifolia* and *L. x intermedia*) inflorescence development. *Physiologia Plantarum*, 138(2), 150-163.
- Rapinel, V., Santerre, C., Hanaei, F., Belay, J., Vallet, N., Rakotomanomana, N., Vallageas, A., & Chemat, F. (2018). Potentialities of using liquefied gases as alternative solvents to substitute hexane for the extraction of aromas from fresh and dry natural products. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 590-605.
- 118. Guitton, Y., Nicolè, F., Jullien, F., Caissard, J.-C., Saint-Marcoux, D., Legendre, L., Pasquier, B., & Moja, S. (2018). A comparative study of terpene composition in different clades of the genus *Lavandula*. *Botany Letters*, *165*(3-4), 494-505.
- 119. Da Porto, C., Decorti, D., & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia*L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, *112*(4), 1072-1078.
- 120. Da Porto, C., & Decorti, D. (2008). Analysis of the volatile compounds of flowers and essential oils from *Lavandula angustifolia* cultivated in Northeastern Italy by Headspace Solid-Phase Microextraction coupled to Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Planta Medica*, *74*(2), 182-187.
- 121. Tomescu, A., Rus, C., Alexa, E., Sumãlan, R., Copolovici, D., & Negrea, M. (2015). Chemical composition of *Lavandula angustifolia* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils cultivated in west Romania. *Research Journal of Agricultural Science*, 47(3), 246-253.
- 122. Tzadou, O., Bazos, I., & Yannitsaros, A. (2009). Essential oil composition enantiomeric distribution of fenchone and camphor of *Lavandula cariensis* and *L. stoechas* subsp. *stoechas* grown in Greece. *Natural Product Communications*, *4*(8), 1103-1106.
- 123. Cerpa, M. G., Mato, R. B., & José Cocero, M. (2008). Modeling steam distillation of essential oils: Application to lavandin super oil. *AIChE Journal*, *54*(4), 909-917.
- 124. Filly, A., Fabiano-Tixier, A. S., Louis, C., Fernandez, X., & Chemat, F. (2016). Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Comptes Rendus Chimie*, *19*(6), 707-717.
- 125. Verma, R., Rahman, L., Chanotiya, C., Verma, R., Chauhan, A., Yadav, A., Singh, A., & Yadav, A. (2010). Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *Journal of the Serbian Chemical Society*, *75*(3), 343-348.
- 126. Costa, P., Grosso, C., Gonçalves, S., Andrade, P. B., Valentão, P., Gabriela Bernardo-Gil, M., & Romano, A. (2012). Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chemistry*, 135(1), 112-121.

- 127. Dris, D., Tine-Djebbar, F., & Soltani, N. (2017). *Lavandula dentata* Essential Oils: Chemical Composition and Larvicidal Activity Against *Culiseta longiareolata* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *African Entomology*, *25*(2), 387-394.
- 128. Babu, G. D. K., Thakur, V., & Singh, B. (2016). Variability in the composition of *Lavandula angustifolia* extracts due to extraction methods. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *22*(2), 173-182.
- 129. Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., Mozos-Pascual, M. de los, Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products*, 49, 150-159.
- Kara, N., & Baydar, H. (2013). Determination of lavender and lavandin cultivars (*Lavandula sp.*) containing high quality essential oil in Isparta, Turkey. *Turkish Journal of Field Crops*, 18(1), 58-65.
- 131. Zagorcheva, T., Stanev, S., Rusanov, K., & Atanassov, I. (2013). Comparative GC/MS analysis of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) inflorescence and essential oil volatiles. *Agricultural Science and Technology*, *5*(4), 459-462.
- 132. Carrasco, A., Tomas, V., Tudela, J., & Miguel, M. G. (2016). Comparative study of GC-MS characterization, antioxidant activity and hyaluronidase inhibition of different species of *Lavandula* and *Thymus* essential oils: Comparative study of *Lavandula* and *Thymus* essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, *31*(1), 57-69.
- 133. Liu, X., & Locasale, J. W. (s. d.). Metabolomics: a primer. *Trends in Biochemical Sciences*.
- 134. Lammerink, J., Wallace, A. R., & Porter, N. G. (1989). Effects of harvest time and postharvest drying on oil from lavandin (*Lavandula* × *intermedia*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *17*(4), 315-326.
- 135. Erbas, S., & Baydar, H. (2008). Effects of harvest time and drying temperature on essential oil content and composition in lavandin (*Lavandula x intermedia*). *Turkish Journal of Field Crops*, *13*, 23-31.
- 136. Zheljazkov, V. D., Astatkie, T., & Hristov, A. N. (2012). Lavender and hyssop productivity, oil content, and bioactivity as a function of harvest time and drying. *Industrial Crops and Products*, *36*(1), 222-228.
- 137. Chemat, F., Lucchesi, M. E., Smadja, J., Favretto, L., Colnaghi, G., & Visinoni, F. (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, 555(1), 157-160.
- 138. Ormeño, E., Goldstein, A., & Niinemets, Ü. (2011). Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *30*(7), 978-989.
- 139. Ormeño, E., Fernandez, C., & Mévy, J.-P. (2007). Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry*, *68*(6), 840-852.
- Llusia, J., & Penuelas, J. (2000). Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. *American Journal of Botany*, 87(1), 133-140.

- Bowman, J. M., Braxton, M. S., Churchill, M. A., Hellie, J. D., Starrett, S. J., Causby, G. Y., Ellis, D. J., Ensley, S. D., Maness, S. J., Meyer, C. D., Sellers, J. R., Hua, Y., Woosley, R. S., & Butcher, D. J. (1997). Extraction method for the isolation of terpenes from plant tissue and subsequent determination by gas chromatography. *Microchemical Journal*, 56(1), 10-18.
- 142. Grigore, A., Paraschiv, I., Colceru-Mihul, S., Bubueanu, C., Draghici, E., & Ichim, M. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(4), 5436-5443.
- 143. Reverchon, E., & De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, *38*(2), 146-166.
- 144. Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Röse, U. S. R., & Schnitzler, J.-P. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, *45*(4), 540-560.
- 145. Xu, J., Chen, G., Huang, S., Qiu, J., Jiang, R., Zhu, F., & Ouyang, G. (2016). Application of *in vivo* solid-phase microextraction in environmental analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *85*, 26-35.
- 146. Tienpont, B., David, F., Bicchi, C., & Sandra, P. (2000). High capacity headspace sorptive extraction. *Journal of Microcolumn Separations*, *12*(11), 577-584.
- 147. Sato, A., Sotomaru, K., Takeda, M., & Sawada, T. (2009). A novel approach for sample adsorption and extraction using a monolithic hybrid adsorbent as a new generation medium. *LC-GC Europe*, 31-32.
- 148. Yang, C., Wang, J., & Li, D. (2013). Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. *Analytica Chimica Acta*, 799, 8-22.
- 149. Kallenbach, M., Oh, Y., Eilers, E. J., Veit, D., Baldwin, I. T., & Schuman, M. C. (2014). A robust, simple, high-throughput technique for time-resolved plant volatile analysis in field experiments. *The Plant Journal*, *78*(6), 1060-1072.
- 150. Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., Sgorbini, B., & Sandra, P. (2007). Sorptive tape extraction in the analysis of the volatile fraction emitted from biological solid matrices. *Journal of Chromatography A*, *1148*(2), 137-144.
- 151. Deasy, W., Shepherd, T., Alexander, C. J., Birch, A. N. E., & Evans, K. A. (2016). Fieldbased evaluation of a novel SPME-GC-MS method for investigation of below-ground interaction between *Brassica* roots and larvae of cabbage root fly, *Delia radicum* L.: Analysis of root volatiles from field-grown *Brassica* by SPME-GC-MS. *Phytochemical Analysis*, 27(6), 343-353.
- 152. Plutowska, B., & Wardencki, W. (2007). Aromagrams Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry*, *101*(2), 845-872.
- 153. Errard, A., Ulrichs, C., Kühne, S., Mewis, I., Drungowski, M., Schreiner, M., & Baldermann, S. (2015). Single-versus multiple-pest infestation affects differently the biochemistry of tomato (*Solanum lycopersicum* 'Ailsa Craig'). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(46), 10103-10111.

- 154. Tia, E. V., Lozano, P., Menut, C., Lozano, Y. F., Martin, T., Niamké, S., & Adima, A. A. (2013). Potentialité des huiles essentielles dans la lutte biologique contre la mouche blanche *Bemisia tabaci* Genn. *Phytothérapie*, *11*(1), 31-38.
- 155. Kumar, P., Pandit, S. S., Steppuhn, A., & Baldwin, I. T. (2014). Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(4), 1245-1252.
- 156. Boggia, L., Sgorbini, B., Bertea, C. M., Cagliero, C., Bicchi, C., Maffei, M. E., & Rubiolo, P. (2015). Direct Contact Sorptive Tape Extraction coupled with Gas Chromatography Mass Spectrometry to reveal volatile topographical dynamics of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) upon herbivory by *Spodoptera littoralis* Boisd. *BMC Plant Biology*, *15*(102), 1-13.
- 157. Gordin, A., & Amirav, A. (2000). SnifProbe: new method and device for vapor and gas sampling. *Journal of Chromatography A*, *903*(1-2), 155-172.
- 158. Kremser, A., Jochmann, M. A., & Schmidt, T. C. (2016). Systematic comparison of static and dynamic headspace sampling techniques for gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(24), 6567-6579.
- 159. Ciccioli, P., Cecinato, A., Brancaleoni, E., Frattoni, M., & Liberti, A. (1992). Use of carbon adsorption traps combined with high resolution gas chromatography mass spectrometry for the analysis of polar and non-polar C4-C14 hydrocarbons involved in photochemical smog formation. *Journal of High Resolution Chromatography*, *15*(2), 75-84.
- 160. Agelopoulos, N. G., & Pickett, J. A. (1998). Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *Journal of Chemical Ecology*, *24*(7), 1161-1172.
- 161. Pio, C., Silva, P., Cerqueira, M., & Nunes, T. (2005). Diurnal and seasonal emissions of volatile organic compounds from cork oak (*Quercus suber*) trees. *Atmospheric Environment*, *39*(10), 1817-1827.
- Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., & Rubiolo, P. (2008). Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography A*, *1184*(1-2), 220-233.
- 163. Han, H. J., Lee, S. H., Moon, J. Y., Park, S., Dong, H., & Noh, B. S. (2016). Discrimination of the cultivar, growing region, and geographical origin of rice (*Oryza sativa*) using a mass spectrometer-based electronic nose. *Food Science and Biotechnology*, 25(3), 695-700.
- 164. McComb, M. (1997). Microextraction of volatile organic compounds using the inside needle capillary adsorption trap (INCAT) device. *Talanta*, *44*(11), 2137-2143.
- 165. Tranchant, J. (1996). Chromatographie en phase gazeuse. *Techniques de l'ingénieur*, *3*, 1485.
- 166. Fernandez, X., & Chémat, F. (2012). *La chimie des huiles essentielles : tradition et innovation*. Paris: Vuibert.

- 167. Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D., Duverger-Arfuso, C., & Martel, A. (2016). *Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales*. Paris: Dunod.
- 168. Marriott, P. J., Shellie, R., & Cornwell, C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*, *936*(1-2), 1-22.
- 169. Bagneres, A.-G. (2016). *Chemical ecology*. Hoboken, NJ: ISTE Ltd/John Wiley and Sons Inc.
- 170. Fernandez, X., Filippi, J.-J., & Jeanville, M. (2011). Chromatographie en phase gazeuse à deux dimensions : GC-GC et GCxGC. *Techniques de l'ingénieur*, *1*, 1489.
- 171. Barbosa-Cornelio, R., Cantor, F., Coy-Barrera, E., & Rodríguez, D. (2019). Tools in the investigation of volatile semiochemicals on insects: from sampling to statistical analysis. *Insects*, *10*(8), 241.
- 172. Fernandez, X., Breme, K., & Varlet, V. (2009). Couplage chromatographie en phase gazeuse/olfactométrie. *Techniques de l'ingénieur*, *1*, 1488.
- Dewulf, J., Van Langenhove, H., & Wittmann, G. (2002). Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. *Trends in analytical chemistry*, *21*(9+10), 637-646.
- 174. Dolgorouky, C. (2012, février 17). *Mesure de la réactivité atmosphérique totale avec lesradicaux hydroxyles (OH) : développement etapplications en lle-de-France* (Thèse en Physique de l'Environnement). Université Paris-Sud XI, Paris.
- 175. Crespo, E., Cristescu, S. M., de Ronde, H., Kuijper, S., Kolk, A. H. J., Anthony, R. M., & Harren, F. J. M. (2011). Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry detects rapid changes in volatile metabolite emission by *Mycobacterium smegmatis* after the addition of specific antimicrobial agents. *Journal of Microbiological Methods*, 86(1), 8-15.
- 176. Kim, S., Karl, T., Helmig, D., Daly, R., Rasmussen, R., & Guenther, A. (2009). Measurement of atmospheric sesquiterpenes by proton transfer reaction-mass spectrometry (PTR-MS). *Atmospheric Measurement Techniques*, *2*(1), 99-112.
- 177. D'Auria, J. C., Pichersky, E., Schaub, A., Hansel, A., & Gershenzon, J. (2007). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (*Z*)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*: Arabidopsis CHAT acyltransferase. *The Plant Journal*, 49(2), 194-207.
- 178. Harren, F. J. M., & Cristescu, S. M. (2013). Online, real-time detection of volatile emissions from plant tissue. *AoB PLANTS*, *5*, plt003.
- 179. Hervé, M. R., Nicolè, F., & Lê Cao, K.-A. (2018). Multivariate analysis of multiple datasets: a practical guide for chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, *44*(3), 215-234.
- 180. Xia, J., & Wishart, D. S. (2011). Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. *Nature Protocols*, *6*(6), 743-760.
- 181. Lommen, A., & Kools, H. J. (2012). MetAlign 3.0: performance enhancement by efficient use of advances in computer hardware. *Metabolomics*, *8*(4), 719-726.

- Katajamaa, M., Miettinen, J., & Oresic, M. (2006). MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*, 22(5), 634-636.
- 183. Guitton, Y., Tremblay-Franco, M., Le Corguillé, G., Martin, J.-F., Pétéra, M., Roger-Mele, P., Delabrière, A., Goulitquer, S., Monsoor, M., Duperier, C., Canlet, C., Servien, R., Tardivel, P., Caron, C., Giacomoni, F., & Thévenot, E. A. (2017). Create, run, share, publish, and reference your LC–MS, FIA–MS, GC–MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *93*, 89-101.
- 184. Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*, *78*(3), 779-787.
- 185. Filzmoser, P., Hron, K., & Reimann, C. (2009). Principal component analysis for compositional data with outliers. *Environmetrics*, *20*(6), 621-632.
- Saccenti, E., Hoefsloot, H. C. J., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A., & Hendriks, M. M. W. B. (2014). Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. *Metabolomics*, 10(3), 361-374.
- 187. Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, *8*(S1), 3-16.
- 188. van Den Dool, H., & Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.
- 189. D'Alessandro, M., & Turlings, T. C. J. (2006). Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. *The Analyst*, *131*(1), 24-32.
- 190. Stenberg, J. A., Heil, M., Åhman, I., & Björkman, C. (2015). Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. *Trends in Plant Science*, *20*(11), 698-712.
- 191. Kessler, A. (2015). The information landscape of plant constitutive and induced secondary metabolite production. *Current Opinion in Insect Science*, *8*, 47-53.
- 192. E. M. Vet, L., Van Lenteren, J. C., Heymans, M., & Meelis, E. (1983). An aiflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and other small insects. *Physiological Entomology*, *8*, 97-106.
- 193. Ruther, J., & L. M. Steidle, J. (2000). Mites as matchmakers: semiochemicals from hostassociated mites attract both sexes of the parasitoid *Lariophagus distinguendus*. *Journal of Chemical Ecology*, *26*(5), 1205-1217.
- 194. Steinberg, S., Dicke, M., E. M. Vet, L., & Wanningen, R. (1992). Response of the braconid parasitoid *Cotesia* (*=Apanteles*) *glomerata* to volatile infochemicals: effects of bioassay set-up, parasitoid age and experience and barometric flux. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *63*, 163-175.

- 195. Romani, R., Rossi Stacconi, M. V., Riolo, P., & Isidoro, N. (2009). The sensory structures of the antennal flagellum in *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Fulgoromorpha: Cixiidae): A functional reduction? *Arthropod Structure & Development*, *38*(6), 473-483.
- 196. Chuche, J., Danet, J.-L., Rivoal, J.-B., Arricau-Bouvery, N., & Thiéry, D. (2018). Minor cultures as hosts for vectors of extensive crop diseases: Does *Salvia sclarea* act as a pathogen and vector reservoir for lavender decline? *Journal of Pest Science*, *91*(1), 145-155.
- 197. Wenke, K., Kai, M., & Piechulla, B. (2010). Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta*, *231*(3), 499-506.
- 198. Peñuelas, J., Asensio, D., Tholl, D., Wenke, K., Rosenkranz, M., Piechulla, B., & Schnitzler, J. P. (2014). Biogenic volatile emissions from the soil: Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant, Cell & Environment*, *37*(8), 1866-1891.
- 199. Jung, S. C., Martinez-Medina, A., Lopez-Raez, J. A., & Pozo, M. J. (2012). Mycorrhizainduced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, *38*(6), 651-664.
- 200. Robert, C. A. M., Erb, M., Duployer, M., Zwahlen, C., Doyen, G. R., & Turlings, T. C. J. (2012). Herbivore-induced plant volatiles mediate host selection by a root herbivore. *New Phytologist*, *194*(4), 1061-1069.
- 201. Van der Putten, W. H., Vet, L. E. M., Harvey, J. A., & Wäckers, F. L. (2001). Linking aboveand belowground multitrophic interactions of plants, herbivores, pathogens, and their antagonists. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(10), 547-554.
- 202. Kigathi, R. N., Unsicker, S. B., Reichelt, M., Kesselmeier, J., Gershenzon, J., & Weisser, W. W. (2009). Emission of Volatile Organic Compounds after herbivory from *Trifolium pratense* (L.) under laboratory and field conditions. *Journal of Chemical Ecology*, 35(11), 1335-1348.
- 203. Delory, B. M., Delaplace, P., Fauconnier, M.-L., & du Jardin, P. (2016). Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions? *Plant and Soil*, *402*(1-2), 1-26.
- Ali, J. G., Alborn, H. T., Campos-Herrera, R., Kaplan, F., Duncan, L. W., Rodriguez-Saona, C., Koppenhöfer, A. M., & Stelinski, L. L. (2012). Subterranean, herbivore-induced plant volatile increases biological control activity of multiple beneficial nematode species in distinct habitats. *PLoS ONE*, 7(6), e38146.
- 205. Deasy, W., Shepherd, T., Alexander, C. J., Birch, A. N. E., & Evans, K. A. (2016). Development and validation of a SPME-GC-MS Method for *In situ* passive sampling of root volatiles from glasshouse-grown broccoli plants undergoing below-ground herbivory by larvae of cabbage root fly, *Delia radicum* L: *In situ* analysis of Brassica root volatiles by SPME-GC-MS. *Phytochemical Analysis*, *27*(6), 375-393.
- 206. Crespo, E., Hordijk, C. A., de Graaf, R. M., Samudrala, D., Cristescu, S. M., Harren, F. J. M., & van Dam, N. M. (2012). On-line detection of root-induced volatiles in *Brassica* nigra plants infested with *Delia radicum* L. root fly larvae. *Phytochemistry*, *84*, 68-77.

- 207. van Dam, N. M., Samudrala, D., Harren, F. J. M., & Cristescu, S. M. (2012). Real-time analysis of sulfur-containing volatiles in Brassica plants infested with root-feeding *Delia radicum* larvae using proton-transfer reaction mass spectrometry. *AoB Plants, 2012*, pls021.
- 208. Danner, H., Brown, P., Cator, E. A., Harren, F. J. M., van Dam, N. M., & Cristescu, S. M. (2015). Aboveground and belowground herbivores synergistically induce volatile organic sulfur compound emissions from shoots but not from roots. *Journal of Chemical Ecology*, 41(7), 631-640.
- 209. Eilers, E. J., Pauls, G., Rillig, M. C., Hansson, B. S., Hilker, M., & Reinecke, A. (2015). Novel set-up for low-disturbance sampling of volatile and non-volatile compounds from plant roots. *Journal of Chemical Ecology*, *41*(3), 253-266.
- 210. Abraham, J., Giacomuzzi, V., & Angeli, S. (2015). Root damage to apple plants by cockchafer larvae induces a change in volatile signals below- and above-ground. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 156(3), 279-289.
- 211. Kihika, R., Murungi, L. K., Coyne, D., Ng'ang'a, M., Hassanali, A., Teal, P. E. A., & Torto, B. (2017). Parasitic nematode *Meloidogyne incognita* interactions with different *Capsicum annum* cultivars reveal the chemical constituents modulating root herbivory. *Scientific Reports*, 7(1), 2903.
- 212. Bajalan, I., Rouzbahani, R., Pirbalouti, A. G., & Maggi, F. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of Iranian *Lavandula × hybrida*. *Chemistry & Biodiversity*, *14*(7), e1700064.
- 213. Rebey, I. B., Bourgou, S., Tounsi, M. S., Fauconnier, M. L., & Ksouri, R. (2017). Phytochemical composition and antioxidant activity of *Lavandula dentata* extracts. *Journal of New Sciences*, *39*(2), 2096-2105.
- 214. Barthès, N., Caissard, J.-C., Just, J., & Fernandez, X. (2016). Chemical, biological and computational tools in chemical ecology. In A.-G. Bagnères & M. Hossaert-Mckey (Éd.), *Chemical Ecology* (p. 161-184). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- 215. Mohney, B. K., Matz, T., LaMoreaux, J., Wilcox, D. S., Gimsing, A. L., Mayer, P., & Weidenhamer, J. D. (2009). *In situ* silicone tube microextraction: a new method for undisturbed sampling of root-exuded thiophenes from Marigold (*Tagetes erecta* L.) in soil. *Journal of Chemical Ecology*, *35*(11), 1279-1287.
- 216. Stierlin, E., Michel, T., & Fernandez, X. (2017). Techniques d'extraction des composés organiques volatils en écologie chimique. *Spectra Analyse*, (316), 43-52.
- 217. Maggi, F., Papa, F., Cristalli, G., Sagratini, G., & Vittori, S. (2010). Characterisation of the mushroom-like flavour of *Melittis melissophyllum* L. subsp. melissophyllum by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography (GC–FID) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *Food Chemistry*, *123*(4), 983-992.
- 218. Hiltpold, I., & Turlings, T. C. J. (2008). Belowground chemical signaling in maize: when simplicity rhymes with efficiency. *Journal of Chemical Ecology*, *34*(5), 628-635.

- 219. Kędziora-Koch, K., & Wasiak, W. (2018). Needle-based extraction techniques with protected sorbent as powerful sample preparation tools to gas chromatographic analysis: Trends in application. *Journal of Chromatography A*, *1565*, 1-18.
- 220. Ábalos, M., Bayona, J. M., & Pawliszyn, J. (2000). Development of a headspace solidphase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters. *Journal of Chromatography A*, *873*(1), 107-115.
- 221. Sun, D., She, J., Gower, J., Stokes, C., Windham, G., Baird, R., & Mlsna, T. (2016). Effects of growth parameters on the analysis of *Aspergillus flavus* volatile metabolites. *Separations*, *3*(2), 13.
- 222. Risticevic, S., Lord, H., Górecki, T., Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (2010). Protocol for solidphase microextraction method development. *Nature Protocols*, *5*(1), 122-139.
- 223. Zhang, Zhouyao., & Pawliszyn, Janusz. (1995). Quantitative extraction using an internally cooled Solid Phase Microextraction device. *Analytical Chemistry*, *67*(1), 34-43.
- 224. Andersen, T., Cozzi, F., & Simonsen, H. (2015). Optimization of biochemical screening methods for volatile and unstable sesquiterpenoids using HS-SPME-GC-MS. *Chromatography*, 2(2), 277-292.
- 225. Hübschmann, H.-J. (2015). *Handbook of GC-MS: fundamentals and applications ; [gas chromatography mass spectrometry]* (3rd ed.). Weinheim: Wiley-VCH.
- 226. Saint-Lary, L., Roy, C., Paris, J.-P., Tournayre, P., Berdagué, J.-L., Thomas, O. P., & Fernandez, X. (2014). Volatile compounds of *Viola odorata* absolutes: identification of odorant active markers to distinguish plants originating from France and Egypt. *Chemistry & Biodiversity*, *11*(6), 843-860.
- 227. Bajalan, I., & Pirbalouti, A. G. (2015). Variation in chemical composition of essential oil of populations of *Lavandula × intermedia* collected from Western Iran. *Industrial Crops and Products*, *69*, 344-347.
- 228. Chen Xiao Hua. (2011). Evaluation of essential oil composition and DNA diversity of mint resources from China. *African Journal of Biotechnology*, *10*(74), 16740-16745.
- 229. Hosni, K., Msaâda, K., Ben Taârit, M., Chahed, T., & Marzouk, B. (2011). Volatile constituents of two Hypericum species from Tunisia. *Natural Product Communications*, *6*(11), 1731-1734.
- 230. Binello, A., Orio, L., Pignata, G., Nicola, S., Chemat, F., & Cravotto, G. (2014). Effect of microwaves on the *in situ* hydrodistillation of four different Lamiaceae. *Comptes Rendus Chimie*, *17*(3), 181-186.
- Maia, N. B., Bovi, O. A., Perecin, M. B., Marques, M. O. M., Granja, N. P., & Trujillo, A. L. (2004). New crops with potential to produce essential oil with high linalool content helping preserve rosewood an endangered Amazon species. *Acta Horticulturae*, 629, 39-43.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., & Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5(2-3), 293-308.
- 233. Benelli, G., Flamini, G., Canale, A., Cioni, P. L., & Conti, B. (2012). Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Protection*, *42*, 223-229.
- 234. Polatoğlu, K., Gören, N., Başer, K. H. C., & Demirci, B. (2009). The variation in the essential oil composition of *Tanacetum cadmeum* (Boiss.) Heywood ssp. *orientale* Grierson from Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, *21*(2), 97-100.
- 235. Belhadj Mostefa, M., Kabouche, A., Abaza, I., Aburjai, T., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2014). Chemotypes investigation of *Lavandula* essential oils growing at different North African soil. *J. Mater. Environ. Sci.*, *5*(6), 1896-1901.
- 236. Monsef-Esfahani, H. R., Karamkhani, F., Nickavar, B., Abdi, K., & Faramarzi, M. A. (2007). The volatile constituents of *Dracocephalum kotschyi* oils. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(1), 40-43.
- 237. Yiguang Wang, Xiran Li, Qinjie Jiang, Hainan Sun, Jiafu Jiang, Sumei Chen, Zhiyong Guan, Weimin Fang, & Fadi Chen. (2018). GC-MS analysis of the volatile constituents in the leaves of 14 compositae plants. *Molecules*, *23*(1), 166.
- 238. Roger, B., Fernandez, X., Jeannot, V., & Chahboun, J. (2010). An alternative method for irones quantification in iris rhizomes using headspace solid-phase microextraction. *Phytochemical Analysis*, *21*(5), 483-488.
- 239. Zhang, C., Qi, M., Shao, Q., Zhou, S., & Fu, R. (2007). Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME–GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *44*(2), 464-470.
- 240. Wehrens, R., Weingart, G., & Mattivi, F. (2014). metaMS: An open-source pipeline for GC–MS-based untargeted metabolomics. *Journal of Chromatography B*, *966*, 109-116.
- 241. Ubersfeld, D. (2016, octobre 13). *Influence des molécules antioxydantes produites par des plantes sur l'évolution physico-chimique et microbiologique de l'argilite du Callovo-Oxfordien* (Thèse en Géosciences). Université de Lorraine.
- 242. Yvin, C., Chaisse, E., Fontaine, M., Rivoal, J. B., Verdin, E., Nicolè, F., Jourdan, P., Savarit, P., & Gallois, P. (2017). Dépérissement de la lavande et du lavandin : mise en œuvre d'un programme de recherches appliquées afin d'apporter des solutions de lutte aux producteurs. *Innovations Agronomiques*, 55, 107-120.
- 243. Razavi, S. M. (2011). Plant coumarins as allelopathic agents. *International Journal of Biological Chemistry*, *5*(1), 86-90.
- 244. Steeghs, M., Bais, H. P., de Gouw, J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *135*(1), 47-58.
- 245. Goupy, J. (2006). Tutoriel : Les plans d'expériences. Modulad, (34), 74-116.
- 246. Kessler, A. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, *291*(5511), 2141-2144.

- 247. Mayer, C. J., Vilcinskas, A., & Gross, J. (2008). Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. *Journal of Chemical Ecology*, *34*(12), 1518-1522.
- 248. Proffit, M., Schatz, B., Bessière, J.-M., Chen, C., Soler, C., & Hossaert McKey, M. (2008). Signalling receptivity: Comparison of the emission of volatile compounds by figs of *Ficus hispida* before, during and after the phase of receptivity to pollinators. *Balaban*, *Philadelphia/Rehovot*, 45(1), 15-24.
- 249. Stewart-Jones, A., & Poppy, G. M. (2006). Comparison of glass vessels and plastic bags for enclosing living plant parts for headspace analysis. *Journal of Chemical Ecology*, *32*(4), 845-864.
- 250. Ross, C. F. (2012). Headspace analysis. *Comprehensive sampling and sample preparation*, *2*, 27-50.
- 251. Soria, A. C., García-Sarrió, M. J., & Sanz, M. L. (2015). Volatile sampling by headspace techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 85-99.
- 252. Linskens, H. F., & Allen, M. S. (Éd.). (1997). *Plant volatile analysis*. Berlin: Springer.
- 253. Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnikar, M., Dermastia, M., & Gruden, K. (2009). « Bois noir » phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics*, *10*(1), 460.
- 254. Becker, C., Desneux, N., Monticelli, L., Fernandez, X., Michel, T., & Lavoir, A.-V. (2015). Effects of abiotic factors on HIPV-mediated interactions between plants and parasitoids. *BioMed Research International*, 2015, 1-18.
- 255. Dicke, M. (2009). Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, Cell & Environment, 32*(6), 654-665.
- 256. Dong, F., Fu, X., Watanabe, N., Su, X., & Yang, Z. (2016). Recent advances in the emission and functions of plant vegetative volatiles. *Molecules*, *21*(2), 124.
- 257. Engelberth, J., Alborn, H. T., Schmelz, E. A., & Tumlinson, J. H. (2004). Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(6), 1781-1785.
- 258. Domingo-Almenara, X., Brezmes, J., Vinaixa, M., Samino, S., Ramirez, N., Ramon-Krauel, M., Lerin, C., Díaz, M., Ibáñez, L., Correig, X., Perera-Lluna, A., & Yanes, O. (2016). eRah: A computational tool integrating spectral deconvolution and alignment with quantification and identification of metabolites in GC/MS-based metabolomics. *Analytical Chemistry*, 88(19), 9821-9829.
- 259. Harshman, S. W., Mani, N., Geier, B. A., Kwak, J., Shepard, P., Fan, M., Sudberry, G. L., Mayes, R. S., Ott, D. K., Martin, J. A., & Grigsby, C. C. (2016). Storage stability of exhaled breath on Tenax TA. *Journal of Breath Research*, *10*(4), 046008.
- 260. Kang, S., & Paul Thomas, C. L. (2016). How long may a breath sample be stored for at -80 °C? A study of the stability of volatile organic compounds trapped onto a mixed Tenax:Carbograph trap adsorbent bed from exhaled breath. *Journal of Breath Research*, 10(2), 026011.

- 261. Lavoir, A.-V., Staudt, M., Schnitzler, J.-P., Landais, D., Massol, F., Rocheteau, A., Rodriguez, R., Zimmer, I., & Rambal, S. (2009). Drought reduced monoterpene emissions from *Quercus ilex* trees: results from a throughfall displacement experiment within a forest ecosystem. *Biogeosciences Discussions*, *6*, 863-893.
- 262. Bruce, T. J. A., Midega, C. A. O., Birkett, M. A., Pickett, J. A., & Khan, Z. R. (2010). Is quality more important than quantity? Insect behavioural responses to changes in a volatile blend after stemborer oviposition on an African grass. *Biology Letters*, *6*(3), 314-317.
- 263. Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(4), 459-464.
- 264. Bruce, T. J. A., & Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects Finding the right mix. *Phytochemistry*, *72*(13), 1605-1611.
- 265. De Moraes, C. M., Lewis, W. J., Paré, P. W., Alborn, H. T., & Tumlinson, J. H. (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, *393*(6685), 570-573.
- 266. Chatelard, E., Proffit, M., Nicolè, F., Costes, T., & Lapeyre, B. (2016). *Etude des perceptions olfactives chez la cicadelle* Hyalesthes obsoletus, *hôte intermédiaire de la maladie du dépérissement des lavandes*. Saint-Etienne: Master 2 en Ecologie-Ethologie.
- 267. Iriti, M., Colnaghi, G., Chemat, F., Smadja, J., Faoro, F., & Visinoni, F. A. (2006). Histocytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. *Flavour and Fragrance Journal*, *21*(4), 704-712.
- 268. Kresnowati, M. T. A. P., van Winden, W. A., Almering, M. J. H., ten Pierick, A., Ras, C., Knijnenburg, T. A., Daran-Lapujade, P., Pronk, J. T., Heijnen, J. J., & Daran, J. M. (2006). When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Molecular Systems Biology*, 2(1), 49.
- 269. Lämmerhofer, M., & Weckwerth, W. (Éd.). (2013). *Metabolomics in practice: successful strategies to generate and analyze metabolic data*. Weinheim: Wiley-VCH Verl.
- 270. Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, *8*(3), 303-313.
- 271. Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V., & Weiss, J. (Éd.). (2011). Ultrasound technologies for food and bioprocessing. New York: Springer.
- 272. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *48*, 538-549.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- 274. Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *53*, 10-23.

- 275. Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(2), 161-169.
- 276. Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., & Polissiou, M. G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). Ultrasonics Sonochemistry, 13(1), 54-60.
- 277. D'Alessandro, Leandro Galvan. (2013). *Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa *et ses co-produits*. Lille 1.
- 278. Chen, P., Liu, B., Liu, X., & Fu, J. (2019). Ultrasound-assisted extraction and dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the sensitive determination of essential oil components in lavender. *Analytical Methods*, *11*(11), 1541-1550.
- 279. Baldwin, I. T. (2010). Plant volatiles. Current Biology, 20(9), R392-R397.
- 280. Fu, X., Zhou, Y., Zeng, L., Dong, F., Mei, X., Liao, Y., Watanabe, N., & Yang, Z. (2017). Analytical method for metabolites involved in biosynthesis of plant volatile compounds. *RSC Advances*, 7(31), 19363-19372.
- 281. Tissier, A., Morgan, J. A., & Dudareva, N. (2017). Plant Volatiles: going 'In' but not 'Out' of trichome cavities. *Trends in Plant Science*, *22*(11), 930-938.
- 282. Mofikoya, A. O., Bui, T. N. T., Kivimäenpää, M., Holopainen, J. K., Himanen, S. J., & Blande, J. D. (2019). Foliar behaviour of biogenic semi-volatiles: potential applications in sustainable pest management. *Arthropod-Plant Interactions*, *13*(2), 193-212.
- 283. Spinelli, F., Cellini, A., Marchetti, L., Mudigere, K., & Piovene, C. (2011). Emission and function of Volatile Organic Compounds in response to abiotic stress. In A. Shanker (Éd.), *Abiotic Stress in Plants Mechanisms and Adaptations*. IntechOpen.
- 284. Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *100*, 82-102.
- 285. Da Porto, C., & Decorti, D. (2009). Ultrasound-assisted extraction coupled with under vacuum distillation of flavour compounds from spearmint (carvone-rich) plants: Comparison with conventional hydrodistillation. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*(6), 795-799.
- 286. Kim, H. K., & Verpoorte, R. (2010). Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*, *21*(1), 4-13.
- 287. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry, 34, 540-560.

- 288. Mushtaq, M. Y., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Wilson, E. G. (2014). Extraction for metabolomics: access to the metabolome. *Phytochemical Analysis*, *25*(4), 291-306.
- 289. Saint-Lary, L. (2015, juin 10). Évaluation de l'approche métabolomique pour l'authentification des extraits naturels utilisés dans le secteur arômes et parfums (Thèse en chimie). Université Nice Sophia-Antipolis, Nice.
- 290. Lafhal, S., Vanloot, P., Bombarda, I., Kister, J., & Dupuy, N. (2016). Identification of metabolomic markers of lavender and lavandin essential oils using mid-infrared spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, *85*, 79-90.
- 291. Stierlin, É., Nicolè, F., Costes, T., Fernandez, X., & Michel, T. (2020). Metabolomic study of volatile compounds emitted by lavender grown under open-field conditions: a potential approach to investigate the yellow decline disease. *Metabolomics*, *16*(31).
- 292. Cagliero, C., Sgorbini, B., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P., & Bicchi, C. (2015). Cyclodextrin derivatives as stationary phases for the GC Separation of enantiomers in the flavor and fragrance field. In K.-H. Engel & G. Takeoka (Éd.), *Importance of Chirality to Flavor Compounds* (Vol. 1212, p. 15-34). Washington, DC: American Chemical Society.
- Schenk, H. J., & Seabloom, E. W. (2010). Evolutionary ecology of plant signals and toxins: a conceptual framework. In F. Baluška & V. Ninkovic (Éd.), *Plant communication from an ecological perspective* (p. 1-19). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 294. Sharifi, R., & Ryu, C.-M. (2018). Biogenic volatile compounds for plant disease diagnosis and health improvement. *The Plant Pathology Journal*, *34*(6), 459-469.
- 295. Barreira, L. M. F., Parshintsev, J., Kärkkäinen, N., Hartonen, K., Jussila, M., Kajos, M., Kulmala, M., & Riekkola, M.-L. (2015). Field measurements of biogenic volatile organic compounds in the atmosphere by dynamic solid-phase microextraction and portable gas chromatography-mass spectrometry. *Atmospheric Environment*, *115*, 214-222.
- 296. Sharma, R., Zhou, M., Hunter, M. D., & Fan, X. (2019). Rapid *in situ* analysis of plant emission for disease diagnosis using a portable gas chromatography device. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(26), 7530-7537.
- 297. Zhang, Z., & Li, G. (2010). A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchemical Journal*, *95*(2), 127-139.
- 298. Schwartzberg, E. G., Kunert, G., Stephan, C., David, A., Röse, U. S. R., Gershenzon, J., Boland, W., & Weisser, W. W. (2008). Real-time analysis of alarm pheromone emission by the Pea Aphid (*Acyrthosiphon Pisum*) under predation. *Journal of Chemical Ecology*, 34(1), 76-81.
- 299. Antonio Cellini, Sonia Blasioli, Enrico Biondi, Assunta Bertaccini, Ilaria Braschi, & Francesco Spinelli. (2017). Potential applications and limitations of electronic Nose devices for plant disease diagnosis. *Sensors*, *17*(11), 2596.
- 300. Snyder, D. T., Pulliam, C. J., Ouyang, Z., & Cooks, R. G. (2016). Miniature and fieldable mass spectrometers: recent advances. *Analytical Chemistry*, *88*(1), 2-29.
- 301. Huang, G., Xu, W., Visbal-Onufrak, M. A., Ouyang, Z., & Cooks, R. G. (2010). Direct analysis of melamine in complex matrices using a handheld mass spectrometer. *The Analyst*, *135*(4), 705-711.

- 302. Beck, J. J., Porter, N., Cook, D., Gee, W. S., Griffith, C. M., Rands, A. D., Truong, T. V., Smith, L., & San Román, I. (2015). In-field volatile analysis employing a hand-held portable GC-MS: emission profiles differentiate damaged and undamaged yellow starthistle flower heads. *Phytochemical Analysis*, *26*(6), 395-403.
- 303. Aksenov, A. A., Pasamontes, A., Peirano, D. J., Zhao, W., Dandekar, A. M., Fiehn, O., Ehsani, R., & Davis, C. E. (2014). Detection of Huanglongbing disease using differential mobility spectrometry. *Analytical Chemistry*, *86*(5), 2481-2488.
- 304. Kappers, I. F., Dicke, M., & Bouwmeester, H. J. (2008). Terpenoids in plant signaling: chemical ecology. In *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology* (p. wecb652). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- 305. Contreras, J., Murray, J., Tolley, S., Oliphant, J., Tolley, H., Lammert, S., Lee, E., Later, D., & Lee, M. (2008). Hand-portable Gas Chromatograph-Toroidal ion trap Mass Spectrometer (GC-TMS) for detection of hazardous compounds. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(10), 1425-1434.
- 306. Wong, Y. F., Yan, D., Shellie, R. A., Sciarrone, D., & Marriott, P. J. (2019). Rapid plant volatiles screening using headspace SPME and person-portable Gas Chromatography– Mass Spectrometry. *Chromatographia*, *82*(1), 297-305.
- 307. Perkin Elmer Inc. (2015). Product note: Torion[®] T-9 Portable GC/MS. Waltham, MA: Perkin Elmer Inc.
- 308. Lord, H. L., Zhan, W., & Pawliszyn, J. (2010). Fundamentals and applications of needle trap devices. *Analytica Chimica Acta*, *677*(1), 3-18.
- 309. Ramírez, N., Marcé, R. M., & Borrull, F. (2011). Determination of volatile organic compounds in industrial wastewater plant air emissions by multi-sorbent adsorption and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *91*(10), 911-928.
- 310. Stierlin, É., Nicolè, F., Fernandez, X., & Michel, T. (2019). Development of a Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry method to study Volatile Organic Compounds (VOCs) emitted by Lavender roots. *Chemistry & Biodiversity*, 16(8), e1900280.
- 311. Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2014). Metabolomics: What you see is what you extract. *Phytochemical Analysis*, *25*(4), 289-290.
- 312. Santos, F. J., & Galceran, M. T. (2003). Modern developments in gas chromatographymass spectrometry-based environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2), 125-151.
- 313. Xiao, Z., Li, Q., Niu, Y., Zhou, X., Liu, J., Xu, Y., & Xu, Z. (2017). Odor-active compounds of different lavender essential oils and their correlation with sensory attributes. *Industrial Crops and Products*, *108*, 748-755.
- Khavarpour, M., Vahdat, S. M., Kazemi, S., Moghadamnia, A. A., Hasanzadeh, O., Salimi, Z., & Rahmanpour, N. (2019). Chemical composition, antibacterial and analgesic activity of *Lavandula stoechas* flowers from north of Iran. *International Journal of Engineering*, 32(8).

- 315. Silva-Flores, P. G., Pérez-López, L. A., Rivas-Galindo, V. M., Paniagua-Vega, D., Galindo-Rodríguez, S. A., & Álvarez-Román, R. (2019). Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, 1-9.
- 316. Guillen, M. D., & Cabo, N. (1996). Characterisation of essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *Journal of the Science of Food and AgricultureJournal of Science*, *70*, 359-363.
- 317. Herraiz-Peñalver, D., Cases, M. Á., Varela, F., Navarrete, P., Sánchez-Vioque, R., & Usano-Alemany, J. (2013). Chemical characterization of *Lavandula latifolia* Medik. essential oil from Spanish wild populations. *Biochemical Systematics and Ecology*, *46*, 59-68.
- 318. Martins, R. de P., Gomes, R. A. da S., Malpass, A. C. G., & Okura, M. H. (2019). Chemical characterization of *Lavandula dentata* L. essential oils grown in Uberaba-MG. *Ciência Rural*, *49*(8), e20180964.
- 319. Rafie, S., Namjoyan, F., Golfakhrabadi, F., Yousefbeyk, F., & Hassanzadeh, A. (2016). Effect of lavender essential oil as a prophylactic therapy for migraine: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Herbal Medicine*, *6*(1), 18-23.

Communications écrites et orales

Publications

STIERLIN É., MICHEL T., FERNANDEZ X. **Techniques d'extraction des composés organiques volatils en écologie chimique.** *Spectra Analyse*, 2017; 316: 43-52.

STIERLIN É., NICOLÈ F., FERNANDEZ X., MICHEL T. Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry method to study volatile organic compounds (VOCs) emitted by lavender roots. *Chemistry & Biodiversity*, 2019; 16(8). doi: 10.1002/cbdv.201900280.

STIERLIN É., NICOLÈ F., COSTES T., FERNANDEZ X., MICHEL T. **Metabolomic study of volatile compounds emitted by lavender grown under open-field conditions: A potential approach to investigate the yellow decline disease.** *Metabolomics*, 2020; 16(31). doi: 10.1007/s11306-020-01654-6.

STIERLIN É., MICHEL T, FERNANDEZ X. Field analyses of lavender volatile organic compounds: performance evaluation of a portable gas chromatography-mass spectrometry device. *Phytochemical Analysis*, 2020. doi: 10.1002/pca.2942.

HÉRAL B., STIERLIN É., FERNANDEZ X., MICHEL T. **Phytochemicals from the genus** *Lavandula*: **A review.** *Phytochemistry Reviews*, 2020, submitted.

STIERLIN É., NICOLÈ F., COSTES T., FERNANDEZ X., MICHEL T. Optimisation and application of a metabolomic workflow to characterize stored volatiles compounds involved in the lavender yellow decline disease. *Metabolomics*, in progress.

Communications orales

<u>STIERLIN É.</u>, MICHEL T., FERNANDEZ X. Étude des composés organiques volatils (COVs) impliqués dans le dépérissement de la lavande. **4^è journées scientifiques du GDR MediatEC – Médiation chimique dans l'environnement – Écologie chimique**, 2-4 novembre 2017, Montpellier, France.

<u>STIERLIN É.</u>, NICOLÈ F., FERNANDEZ X., MICHEL T. Évaluation de l'approche métabolomique pour l'étude des interactions chimiques impliquées dans le dépérissement de la lavande. **Conférences autour du Biocontrôle**, 4 avril 2019, Reims, France.

MICHEL T., <u>STIERLIN É.</u> Métabolomique & Méthodes d'extraction en écologie chimique. **MétaSUD, Journées de Métabolomique en Région Sud-Provence-Alpes-Côte d'Azur**, 13 juin 2019, Toulon, France.

Communications posters

<u>STIERLIN É.</u>, NICOLÈ F., CHAISSE E., COSTES T., FERNANDEZ X., MICHEL T. Characterisation of the VOCs involved in the yellow disease: A metabolomic approach. **11^è journées scientifiques du RFMF (Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique)**, 23-25 mai 2018, Liège, Belgique.

<u>STIERLIN É.</u>, NICOLÈ F., MICHEL T., FERNANDEZ X. Development of an efficient method for characterisation of Volatile Organic Compounds (VOCs) involved in yellow disease. **ISC, 32nd International Symposium on Chromatography**, 23-27 septembre 2018, Cannes-Mandelieu, France.

<u>STIERLIN É.</u>, NICOLÈ F., MICHEL T., FERNANDEZ X. Development of an efficient method to characterise lavender root Volatile Organic Compounds (VOCs). **MétaSUD, Journées de Métabolomique en Région Sud – Provence-Alpes-Côte d'Azur**, 12-13 juin 2019, Toulon, France.



<u>Chapitre I.</u>

Annexe 1. Molécules volatiles identifiées dans le genre Lavandula (sous-genre Lavandula)

Function	Trivial name	Molecular formula	Mass	Species	References
Alcohol	4 hoven 1 ol		100	L vintermedia averse super	[01]
Alcohol	4-nexen-1-ol		100	L. x intermedia grosso, super	[81]
Alconol	nexylaiconol	C6H14U	102	L. x intermedia abriai, grosso, super	[18]
Alcohol	octen-1-ol	C8H16O	128	L. x intermedia super	[135]
Alcohol	octen-3-ol	$C_8H_{16}O$	128	L. angustifolia	[73, 75, 120,
				L. x intermedia grosso, super	125, 137, 313,
				L. stoechas	314]
Alcohol	3-octanol	C ₈ H ₁₈ O	130	L. angustifolia	[73, 81, 120,
				L. angustifolia maillette	313]
				L. x intermedia sumiens, super	
Ester	1-hexvl acetate	C8H16O2	144	L. anaustifolia	[73, 75, 78,
	- ,			L. anaustifolia maillette, matherone	81, 125, 290,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, super	313]
Ester	acetic acid, hexyl ester	C ₈ H ₁₆ O ₂	144	L. x intermedia super	[135]
Ketone	3-octanone	C ₈ H ₁₆ O	128	L. angustifolia	[72, 73, 75,
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	78, 81, 120,
				L. x intermedia abrial, sumian, super	123, 128, 135,
					137, 290, 313]
Alkene	<i>(E)</i> -2-octene	C ₈ H ₁₆	112	L. angustifolia	[72]
Ketone	camphenilone	C9H14O	138	L. viridis	[89]
Ketone	cryptone	C ₉ H ₁₄ O	138	L. angustifolia	[73, 75, 128,
				L. angustifolia sher-e-kashmir	315]
				L. dentata	
				L. x intermedia sumiens	
Ketone	norinone	C9H14O	138	L. viridis	[126]
Ketone	sabina ketone	C9H14O	138	L stoechas stoechas	[122]
Ketone	2,3,5,5-tetramethyl-4-methylene-2-	C9H14O	138	L. stoechas luisieri	[85]
	cyclopenten-1-one				
Aldehyde	(E)-2-nonenal	C9H16O	140	L. x intermedia super	[81]

	Monoterpene nyarocarbons							
Alkene	2-carene	C ₁₀ H ₁₆	136	L. x intermedia abrial, grosso	[81]			
Alkene	3-carene	C ₁₀ H ₁₆	136	L. angustifolia	[81, 88, 313,			
				L. x intermedia abrial, grosso, super	314]			
				L. stoechas				
Alkene	δ-3-carene	C ₁₀ H ₁₆	136	L. angustifolia	[71, 86, 87,			
				L. angustifolia sher-e-kashmir	89, 128, 137]			
				L stoechas				
				L stoechas stoechas				
				L stoechas luisieri				
				L. viridis				
Alkene	camphene	C ₁₀ H ₁₆	136	L. angustifolia	[71, 73, 75,			
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	77, 78, 80–82,			
				L. cariensis	85–89, 118,			
				L. dentata	120–123, 125,			
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	126, 128, 137,			
				L. latifolia	290, 313, 314,			
				L stoechas	316–318]			
				L. stoechas luisieri				
				L stoechas stoechas				
				L. viridis				
Alkene	1-butenylidene cyclohexane	C ₁₀ H ₁₆	136	L. x intermedia abrial, grosso	[81]			
Alkene	cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	L. angustifolia	[76, 87, 89]			
				L. dentata				
				L. lanata				
				L. spica				
				L stoechas,				
				L. viridis				
Alkene	o-cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	L. angustifolia	[71, 120, 121,			
				L stoechas stoechas	313]			
Alkene	p-cymene	C ₁₀ H ₁₄	134	L. angustifolia	[71, 72, 75,			
				L. cariensis	80, 81, 85, 86,			
				L. dentata	88, 120, 122,			
				L. x intermedia abrial, grosso, super	125, 126, 314,			
				L. latifolia	318]			

Alkene	p-cymenene	C10H12	132	L. stoechas L. stoechas luisieri L. stoechas stoechas L. viridis L. x intermedia abrial L stoechas stoechas	[71, 81, 85]
Alkene	limonene	$C_{10}H_{16}$	136	L. stoechas luisieri L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone L. cariensis L. dentata L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. latifolia L stoechas L. stoechas	[71, 73, 77, 78, 81, 86, 87, 120–123, 125, 135, 137, 290, 313, 317, 318]
Alkene Alkene	D-limonene (p-mentha-1,4(8)diene) myrcene	C10H16 C10H16	136 136	L stoechas stoechas L. angustifolia L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir L. cariensis L. dentata L. x intermedia grosso, sumiens, super L. lanata L. spica L. stoechas L stoechas luisieri L stoechas stoechas	[121] [71–73, 75, 76, 86, 88, 89, 120, 122, 128, 135, 315, 318]
Alkene	β-myrcene	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone L. x intermedia abrial, grosso, sumian, super L. latifolia L. stoechas	[78, 80, 81, 123, 125, 137, 290, 313, 314, 316]
Alkene	allo-ocimene	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia L. x intermedia abrial, arosso, super	[72, 81]
Alkene	ocimene	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia L. intermedia super	[76, 135]

Alkene	<i>(E)</i> -β-ocimene (<i>trans</i> -β-ocimene)	C10H16	136	L. lanata L. spica L. viridis L. angustifolia L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir L. cariensis L. x intermedia abrial, grosso, sumiens, super L. stoechas	[72, 73, 81, 120, 122, 123, 125, 128, 137, 314]
Alkene	<i>(Z)</i> -ocimene (<i>cis</i> -ocimene)	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia L stoechas stoechas	[71, 75, 313, 314]
Alkene	<i>(Z)</i> -β-ocimene (<i>cis</i> -β-ocimene)	C ₁₀ H ₁₆	136	L. angustifolia, L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir L. cariensis L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. latifolia L. stoechas luisieri L. viridis	[72, 73, 78, 81, 86, 120– 123, 126, 128, 137, 290, 317]
Alkene	phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	L. stoechas	[314]
Alkene	α-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia	[75, 120, 121]
Alkene	β-phellandrene	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia sher-e-kashmir L. latifolia L stoechas L. stoechas luisieri L stoechas stoechas	[71, 85, 87, 128, 317]
-	<i>cis</i> -pinane	$C_{10}H_{18}$	138	L stoechas stoechas	[71]

Alkene	α-pinene	C10H16	136	L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir L. cariensis L. dentata L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. lanata L. latifolia L. spica L. stoechas L. stoechas L. stoechas stoechas L. viridis	[71–73, 75– 78, 80–82, 85, 87, 89, 120– 123, 125, 126, 128, 137, 290, 313–318]
Alkene	β-pinene	C10H16	136	L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir L. cariensis L. dentata L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. lanata L. latifolia L. spica L stoechas L stoechas luisieri L stoechas stoechas	[71, 73, 75– 78, 80–82, 86– 89, 118, 120– 122, 126, 128, 137, 290, 313–318]
Alkene	sabinene	C10H16	136	L. viriuis L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir L. cariensis L. dentata L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. lanata L. lanata L. latifolia L. spica L stoechas L stoechas luisieri L stoechas stoechas L. viridis	[71, 73, 76, 78, 80, 81, 86, 88, 89, 120– 122, 125, 137, 290, 314, 316, 317]

Alkene Alkene	sylvestrene α-terpinene	C ₁₀ H ₁₆ C ₁₀ H ₁₆	136 136	L. angustifolia L. angustifolia	[72] [71, 75, 86,
				L. cariensis	89, 121, 122,
				L. latifolia	126, 315, 316]
				L. stoechas luisieri	
				L stoechas stoechas	
				L. viridis	_
Alkene	ɣ-terpinene	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia	[71–73, 75,
				L. cariensis	81, 88, 120,
				L. x intermedia abrial, grosso, super	122, 137, 314]
				L. stoechas	
				L. stoechas stoechas	1
Alkene	terpinolene	$C_{10}H_{16}$	136	L. angustifolia	[72, 73, 81,
				L. angustifolia maillette	86, 120, 122,
				L. cariensis	137, 317]
				L. x intermedia abrial, grosso, super	
				L. latijolia	
				L. stoechas luisieri	
Alleana	a torningland		126	L. Stoechas Stoechas	[71 76 79
Aikene	α-terpinolene	$C_{10}\Pi_{16}$	130	L. angustifolia maillette, matherene	[/1, /0, /8,
				L. dagtata	83, 89, 290, 214, 216, 210]
				L. dentata	514, 510, 519]
				L. X Internieula abria, grosso, sainian, saper	
				L latifolia	
				L. natijona	
				L. spicu L. stoechas	
				L stoechas	
				L viridis	
Alkene	isoterpinolene (p-mentha-2.4(8)-diene)	C10H16	136	L. angustifolig maillette	[73]
		010.110		L, x intermedia arosso, sumiens, super	[. 0]
Alkene	thuja-2,4(10)-diene	C ₁₀ H ₁₄	134	L. angustifolia	[120]
Alkene	α-thujene	C ₁₀ H ₁₆	136	L. angustifolia	[71, 72, 120,
	-			L. latifolia	137, 314, 316,
				L. stoechas stoechas	317]

Alkene	tricyclene	C ₁₀ H ₁₆	136	L. angustifolia, L stoechas, L. viridis L. cariensis, L. stoechas stoechas L. x intermedia abrial, super, grosso, sumiens, L. latifolia	[73, 75, 81, 87, 89, 120– 122, 125, 316]
		0;	xygenated monc	oterpenes	
Alcohol	borneol	C10H18O	154	L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone L. cariensis L. dentata L. x intermedia L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. lanata L. lanata L. latifolia L. spica L. stoechas L stoechas stoechas	[71, 73, 76– 78, 80, 82, 83, 86, 88, 89, 115, 118, 120, 122, 123, 125, 126, 135, 137, 290, 313, 314]
Alcohol Ester	<i>endo</i> -borneol bornyl acetate	C10H18O C12H20O2	154 196	L. latifolia L. angustifolia L. angustifolia sher-e-kashmir L. cariensis L. lanata L. latifolia L. spica L. stoechas L. stoechas L. stoechas stoechas	[316] [71, 75–77, 85, 88, 89, 122, 128]
Ester Alcohol	butanoic acid hexyl ester = hexyl butanoate m-cymen-8-ol	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ C ₁₀ H ₁₄ O	172 150	L. x intermedia super L. angustifolia	[135] [80]
Alcohol	p-cymen-7-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	L. cariensis L. latifolia	[80, 122]

				L. stoechas stoechas	
Alcohol	p-cymen-8-ol	$C_{10}H_{14}O$	150	L. angustifolia	[71, 86, 118,
				L. cariensis	120, 122, 125,
				L. dentata	137]
				L stoechas luisieri	
				L stoechas stoechas	[a · a]
Ester	hexenyl butyrate	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	L. latifolia	[316]
Ester	hexyl butyrate	$C_{10}H_{20}O_2$	172	L. angustifolia	[72, 73, 75,
				L. angustifolia maillette, matherone	78, 81, 290,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. latifolia	313, 316]
Ester	(n-)hexyl isobutyrate	$C_{10}H_{20}O_2$	172	L. angustifolia	[73, 78, 81,
				L. angustifolia maillette, matherone	290]
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	
Alcohol	hotrienol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. stoechas	[85, 314]
				L. stoechas luisieri	
Ketone	6-camphenone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	L. viridis	[89]
Ester	campholenal	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. dentata	[82]
Ester	α-campholenal	$C_{10}H_{16}O$	152	L stoechas stoechas	[71, 122, 126]
				L. viridis	
Ketone	camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. angustifolia	[71–73, 75–
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	78, 80, 82, 83,
				L. cariensis	85–89, 115,
				L. dentata	118, 120–123,
				L. x intermedia	125, 126, 128,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	135, 137, 290,
				L. lanata	313–315, 317,
				L. latifolia	318]
				L. spica	
				L stoechas	
				L. stoechas luisieri	
				L stoechas stoechas	
				L. viridis,	
Phenol	carvacrol = cymophenol	C ₁₀ H ₁₄ O	150	L. lanata	[126]
				L. viridis	
Alcohol	carveol	$C_{10}H_{16}O$	152	L. latifolia	[80]

Alcohol	<i>cis</i> -carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. angustifolia L. cariensis L. stoechas stoechas	[120, 122, 126]
Alcohol	<i>trans</i> -carveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. VIriais L. angustifolia L. cariensis L stoechas stoechas	[71, 75, 118, 122, 314]
Ketone	carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	L. angustifolia L. cariensis L. dentata L. x intermedia sumiens L stoechas stoechas L. viridis	[71, 73, 75, 82, 122, 126]
Ketone	chrysanthenone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	L. angustifolia L. stoechas stoechas	[71, 75]
Alcohol	1,4-cineole	C10H18O	154	L. angustifolia	[120]
Alcohol	1,8-cineole (eucalyptol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. angustifolia L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir L. cariensis L. dentata L. x intermedia L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. latifolia L. stoechas L. stoechas L. stoechas stoechas L. viridis	[120] [71, 73, 75, 78, 80–83, 85– 87, 89, 115, 118, 120–123, 125, 126, 128, 135, 137, 290, 313–318]
Alcohol	3-oxocineole	C10H16O2	168	L. viridis	[89]
Alcohol	2-oxocineole	$C_{10}H_{16}O_2$	168	L. viridis	[89]
Alcohol	citronellol	C10H20O	156	L. dentata	[318]
Aldehyde	cuminaldehyde	C ₁₀ H ₁₂ O	148	L. angustifolia L. cariensis L. x intermedia grosso, sumiens L. stoechas stoechas	[73, 75, 122]
-	2-methyl-3-phenyl-propanal	C ₁₀ H ₁₂ O	148	L. stoechas	[314]
Alcohol	dihydromyrcenol	C ₁₀ H ₂₀ O	156	L. angustifolia	[137]
Alcohol	eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	L. cariensis	[122, 126]

				L stoechas stoechas L. viridis	
Alcohol	(E)-isoeugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	L. angustifolia	[125]
Alcohol	fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. dentata	[82]
Alcohol	endo-fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. anaustifolia	[71, 120]
				L stoechas stoechas	
Alcohol	<i>exo</i> -fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. stoechas stoechas	[122]
Ketone	fenchone	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. cariensis	[71, 76, 82,
				L. dentata	85, 86, 88,
				L. lanata	118, 122, 318]
				L. stoechas	
				L. stoechas luisieri	
				L stoechas stoechas	
Ketone	D-fenchone	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L stoechas	[87]
Aldehyde	geranial	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. cariensis	[122]
				L. stoechas stoechas	
Alcohol	geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. angustifolia	[80, 81, 115,
				L. x intermedia	135, 313, 317]
				L. x intermedia abrial, grosso, super	
				L. latifolia	
Alcohol	<i>trans</i> -geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. stoechas	[314]
Alcohol	lavandulol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. angustifolia	[72, 73, 75,
				L. angustifolia maillette, matherone	76, 78, 81, 86,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, super	120, 125, 290,
				L. lanata	313]
				L. stoechas luisieri	
				L. stoechas stoecha	
Alkene	limonene dioxide	$C_{10}H_{16}O$	152	L. x intermedia	[115]
Alcohol	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. angustifolia	[71–73, 75–
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	78, 80, 81, 86–
				L. cariensis	88, 118, 120–
				L. dentata	123, 125, 126,
				L. x intermedia	128, 135, 137,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	290, 313, 314,
				L. lanata	316–318]
				L. latifolia	
				L. spica	

Alcohol Alcohol	β-linalool linalool oxide	C10H18O C10H18O2	154 170	L stoechas L stoechas luisieri L stoechas stoechas L. viridis L. dentata L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone L. x intermedia L. x intermedia L. x intermedia abrial, grosso, sumian, super L. latifolia	[315] [78, 80, 115, 126, 290, 316]
Alcohol	<i>cis</i> -linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	L. angustifolia L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir L. cariensis L. dentata L. x intermedia grosso, sumiens, super L. latifolia L. stoechas L. stoechas L. stoechas luisieri L. viridis	[72, 73, 75, 83, 85, 89, 120, 122, 125, 126, 128, 314, 316]
Alcohol	<i>trans</i> -linalool oxide	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	L. angustifolia L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir L. x intermedia grosso, sumiens, super L. latifolia L. stoechas luisieri L. viridis	[73, 75, 85, 89, 120, 125, 126, 128, 316]
Ester	linalyl acetate	C10H20O2	196	L. angustifolia L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir L. cariensis L. x intermedia L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super L. latifolia L. stoechas L. stoechas L. viridis	[72, 73, 75– 78, 81, 86, 88, 115, 120, 122, 123, 128, 135, 290, 313, 314, 317]
Ester	myrtenal	C ₁₀ H ₁₄ O	150	L. cariensis L. dentata	[71, 82, 118, 122, 126]

Alcohol	myrtenol	C10H16O	152	L stoechas stoechas L. viridis L. angustifolia L. cariensis L. dentata L. latifolia L stoechas L. stoechas luisieri L. stoechas stoechas	[80, 82, 86, 87, 118, 122, 125, 126, 315, 318]
Alcohol	α-necrodol (isomer)	C10H18O	154	L. stoechas luisieri	[86]
Alcohol	neoisomenthol	C10H20O	156	L. anaustifolia	[120]
Alcohol	trans-a-necrodol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	L. stoechas luisieri	[85, 86]
Ester	$trans-\alpha$ -necrodyl acetate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	196	L. stoechas luisieri	[85, 86]
Ester	α-necrodyl acetate (isomer)	$C_{10}H_{20}O_2$	196	L. stoechas luisieri	[86]
Alcohol	nerol	C10H18O	154	L. angustifolia	[73, 75, 125,
				L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir	128, 135, 313,
				L. x intermedia grosso, sumiens, super	317]
				L. latifolia	
Alkene	3,7-octadiene-2,6-diol,2,6-dimethyl	$C_{10}H_{18}O_2$	170	L. dentata	[83]
Ester	3-octanol acetate	$C_{10}H_{20}O_2$	172	L. angustifolia maillette	[73]
Ester	octen-1-ol acetate	C10H18O	170	L. angustifolia	[78, 120, 290]
				L. angustifolia maillette, matherone	
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, super	
Ester	octen-3-yl-acetate	$C_{10}H_{18}O_2$	170	L. angustifolia	[73, 120, 125,
				L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir	128, 313]
				L. x intermedia grosso, sumiens, super	
Ester	octyl acetate	$C_{10}H_{20}O_2$	172	L. angustifolia	[313]
Ketone	1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo(2.2.2)octan-5- one	$C_{10}H_{16}O_2$	168	L. latifolia	[316]
Alcohol	p-mentha-1,5-dien-8-ol	$C_{10}H_{16}O$	152	L stoechas stoechas	[71, 122]
Alcohol	trans-p-mentha-2,8-dien-1-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. stoechas	[314]
Alkene	perillene	$C_{10}H_{14}O$	150	L. angustifolia	[120]
Alcohol	perillol (p-mentha-1,8-dien-7-ol)	$C_{10}H_{16}O$	152	L. x intermedia abrial, grosso, super	[81]
Ester	2-phenyl ethyl acetate	$C_{10}H_{12}O_2$	164	L. cariensis	[122]
				L. stoechas stoechas	

Ketone	pinocamphone	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. latifolia	[316]
Ketone	<i>cis</i> -pinocamphone	$C_{10}H_{16}O$	152	L stoechas stoechas L viridis	[71, 89]
Alcohol	trans-pinocarveol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L. angustifolia	[71, 80, 86,
				L. dentata	120, 314, 315]
				L. latifolia	
				L. stoechas	
				L stoechas luisieri	
				L stoechas stoechas	
Ketone	pinocarvone	C ₁₀ H ₁₄ O	150	L. cariensis	[71, 82, 122,
				L. dentata	126, 315, 318]
				L stoechas stoechas	
				L. viridis	
Ketone	piperitone	C10H16O	152	L. angustifolia	[75]
Ester	hexyl 2-methylpropanoate	$C_{10}H_{20}O_2$	172	L. latifolia	[316]
Ester	sabinene hydrate	C10H18O	154	L. x intermedia abrial, super, grosso	[81]
Ester	<i>cis</i> -sabinene hydrate	C10H18O	154	L. angustifolia	[/3, 118, 120,
				L. x intermedia grosso, sumiens, super	137, 316]
Fata n	turne ophinene hudurte		154	L. latifolia	
Ester	trans-sabinene hydrate	$C_{10}H_{18}O$	154	L. angustifolia	[/2, //, 86]
				L. Idtifolia	
Alcohol	torninon 4 ol	Culture	154	L. Sloechus iuisien	
Alconol	terpinen-4-oi	C10H18O	154	L. Ungustifolia maillette, matherene, cher e kachmir	[/1-/3,/3, 01 02 77
				L. ungustijonu mumette, mutherone, sher-e-kushinin	//, /0, 01-05,
				L. contensos	00, 03, 120- 102 105 106
				L. dentatu L. v intermedia abrial, arosso, sumian sumiens, super	123, 123, 120, 128, 137, 200
				L latifolia	215_217]
				L stoechas	515 517]
				L stoechas stoechas	
				L viridis	
Alcohol	terpineol	C10H18O	154	L. x intermedia super	[135]
Alcohol	α-terpineol	C10H18O	154	L. anaustifolia	[73, 75, 77,
	·····	-10-10-		L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	78, 80, 81. 88.
				L. cariensis	89, 120–123.
				L. dentata	125, 128, 137.
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	290, 313–318]

Alcohol Ketone Alcohol	δ-terpineol <i>trans</i> -thujone thymol	C ₁₀ H ₁₈ O C ₁₀ H ₁₆ O C ₁₀ H ₁₄ O	154 152 150	L. latifolia L. stoechas L. stoechas stoechas L. viridis L. dentata L. latifolia L. viridis L stoechas stoechas L. latifolia L. stoechas	[80, 89, 315] [71] [71, 88, 317]
Alcohol	cis-verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	152	L stoechas stoechas L. dentata L. latifolia	[71, 82, 317]
Alcohol Ketone	<i>trans</i> -verbenol verbenone	C ₁₀ H ₁₆ O C ₁₀ H ₁₄ O	152 150	L stoechas stoechas L stoechas luisieri L. angustifolia L. cariensis L. latifolia L. stoechas L stoechas L. viridis	[86] [71, 75, 88, 89, 122, 126, 314, 316, 317]
Ester Ester	endo-bornyl formate hexyl 2-methylbutyrate	C ₁₁ H ₁₈ O ₂ C ₁₁ H ₂₂ O ₂	182 186	L. latifolia L. angustifolia L. angustifolia maillette L. x intermedia grosso, sumiens, super L. latifolia	[316] [73, 81, 120, 316]
Ester Ester Ester Ester	hexyl 3-methylbutanoate hexyl methyl ester hexyl pentanoate hexyl tiglate	$\begin{array}{c} C_{11}H_{22}O_2\\ C_{11}H_{22}O_2\\ C_{11}H_{22}O_2\\ C_{11}H_{20}O_2\end{array}$	186 186 186 184	L. x intermedia grosso, sumiens, super L. x intermedia abrial, super L. latifolia L. angustifolia L. x intermedia sumiens, grosso, super L. latifolia L. stoechas	[73] [81] [316] [72, 73, 314, 316]
Ester Ester Ester	hexyl valerate hydrocinnamyl acetate bornyl formate	C11H22O2 C11H14O2 C11H18O2	186 178 182	L. x intermedia abrial, super, grosso L. cariensis L. stoechas	[81] [122] [314]

Ester	isobornyl formate	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	182	L. angustifolia L. angustifolia sher-e-kashmir L. x intermedia abrial, sumiens, super L. viridis	[72, 73, 81, 120, 126, 128]
Alcohol	6-undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O	172	L. x intermedia abrial, super, grosso	[81]
Alcohol	<i>n</i> -dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	186	L. angustifolia	[72]
Ester	dihydrolinalool acetate	C12H22O2	198	L. angustifolia	[120]
Ester	fenchyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	L. latifolia	[317]
-	elemicin	$C_{12}H_{16}O_3$	208	L. latifolia	[317]
Ester	endo-fenchyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	L. cariensis	[122]
				L. stoechas stoechas	
Ester	geranyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	L. angustifolia	[72, 73, 75,
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	76, 78, 81, 88,
				L. cariensis	120–122, 125,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	126, 128, 135,
				L. spica	137, 290, 313,
				L. stoechas	314]
				L. stoechas stoechas	
				L. viridis	
Ester	hexanoic acid, hexyl ester = hexyl hexanoate	$C_{12}H_{24}O_2$	200	L. latifolia	[314, 316]
				L. stoechas	
Ester	octyl isobutyrate	$C_{12}H_{24}O_2$	200	L. stoechas	[314]
Ester	isobornyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	L. x intermedia maillette, sumiens	[73, 87, 316]
				L. latifolia	
				L stoechas	
Ester	lavandulyl acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	L. angustifolia	[71–73, 75,
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	78, 81, 86,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	120, 122, 125,
				L. stoechas	128, 290, 314]
				L. stoechas luisieri	
				L stoechas stoechas	
Ester	linalool acetate	$C_{12}H_{20}O_2$	196	L. angustifolia	[137]
Ester	p-menthyl-8-acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198	L. angustifolia	[125]
Ester	myrtenyl acetate	$C_{12}H_{18}O_2$	194	L. cariensis	[71, 86, 122,
				L. stoechas luisieri	126]
				L stoechas stoechas	

Ester	neryl acetate	C12H20O2 C12H20O2	196	L. angustifolia L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir L. cariensis L. x intermedia L. x intermedia abrial, grosso, sumiens, super L. latifolia L. spica L. stoechas L stoechas L stoechas L. viridis L. angustifolia	[72, 73, 75, 76, 81, 88, 115, 120, 122, 123, 125, 126, 128, 135, 313, 314, 316]
Ester	α -terpinyl acetate	C12H20O2	196	L. anaustifolia	[72]
Ester	thymol acetate	$C_{12}H_{16}O_2$	192	L. angustifolia	[125]
Ester	trans-pinocarvyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	L. cariensis L stoechas luisieri L. stoechas stoechas L. viridis	[86, 122, 126]
Ester	trans-verbenyl acetate	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	L stoechas luisieri	[86]
Aldehyde	tridecanal	C ₁₃ H ₂₆ O	198	L. cariensis	[122]
Alkane	tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198	L. stoechas	[88]
Ester	geranyl butyrate	C14H24O	208	L. stoechas	[314]
Ester	linalyl butyrate	C14H24O2	224	L. latifolia	[316]
Ester	lavandulyl isobutyrate	C14H24O2	224	L. angustifolia	[120]

Alkene	α-amorphene	C15H24
Alkene	aromadendrene	C15H24
Alkene	allo-aromadendrene	C ₁₅ H ₂₄
Alcohol	azulol	C ₁₅ H ₁₈
Alkene	bergamotene	C ₁₅ H ₂₄

204	L. x intermedia abrial, grosso	[81]
204	L stoechas	[71, 87]
	L stoechas stoechas	
204	L stoechas stoechas	[71, 122]
198	L. stoechas luisieri	[85]
204	L. angustifolia	[76, 81, 316]
	L. dentata	
	L. x intermedia super, grosso	
	L. latifolia	
	L. spica	

Alkene	α-bergamotene	C15H24	204	L. x intermedia abrial, grosso	[81, 314]
Alkono	R horgamotone	CH.	204	L. Stoechus	[121]
Alkene	p-bergamotene	C15H24	204	L. angustifolia	[121]
Alkene	<i>cis</i> -α-bergamotene	C15H24	204	L. angustijona	[72, 81, 120,
			204	L. X Intermedia abrial, grosso	[]]
Alkene	<i>trans-</i> α-bergamotene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[72, 120, 126,
				L. angustifolia sher-e-kashmir	128]
				L. viridis	
Alkene	bisabolene	C15H24	204	L. dentata	[76, 88]
				L. lanata	
				L. spica	
				L. stoechas	
Alkene	α-bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. dentata	[81, 318]
				L. x intermedia super	
Alkene	<i>(E)</i> -α-bisabolene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. stoechas	[314]
Alkene	(Z)-α-bisabolene	C15H24	204	L. cariensis	[80, 122]
				L. latifolia	
				L stoechas stoechas	
Alkene	(-)-β-bisabolene	C15H24	204	L. angustifolia	[80, 120, 316]
				L. latifolia	
Alkene	β-bourbonene	C15H24	204	L. angustifolia	[120, 126,
				L. latifolia	316]
				L. viridis	-
Alkene	trans-cadina-1(6),4-diene	C ₁₅ H ₂₄	204	L stoechas stoechas	[122]
Alkene	cadinene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[76, 82]
				L. dentata	
				L. spica	
				L. stoechas	
Alkene	ß-cadinene	C15H24	204	L. latifolia	[125, 316]
	p cadimente	015.124		L angustifolia	[]
Alkene	v-cadinene	C1EH24	204	L angustifolia	[72 75 80
/ incerne	i cadinene	0151124	204	L. angustifolia sher-e-kashmir	120 122 123
				L v intermedia super	125, 122, 123,
				L atifolia	123, 128, 310]
				L. Talijona I. stoechas stoechas	
Allena	trans v adinana		204	L Stuetinus Stuetinus	[70]
Alkene	trans-y-cadinene	C15H24	204	L. X Intermedia sumiens	[/3]

Alkene	δ-cadinene	C15H24	204	L. angustifolia L. latifolia L. stoechas	[72, 80, 87, 120, 317]
Alkene	α-calacorene	C15H20	200	L stoechas stoechas	[122]
Alkene	<i>cis</i> -calamenene	C ₁₅ H ₂₂	202	L. latifolia	[80]
Alkene	<i>trans</i> -calamenene	C ₁₅ H ₂₂	202	L. latifolia	[80]
Alkene	caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[76, 80, 87,
				L. dentata	115, 313]
				L. x intermedia	
				L. lanata	
				L. latifolia	
				L. spica	
				L stoechas	
Alkene	α-caryophyllene (α-humulene)	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[71, 72, 81,
				L. angustifolia sher-e-kashmir	128, 313, 316]
				L. x intermedia abrial, grosso, super	
				L. latifolia	
				L stoechas stoechas	
Alkene	β-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	L. angustifolia	[71, 73, 78,
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	118, 121, 123,
				L. dentata	125, 128, 137,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	290, 318]
				L stoechas stoechas	
Alkene	(E)-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	L. angustifolia	[72, 120, 122,
				L. cariensis	314, 317]
				L. latifolia	
				L. stoechas	
				L. stoechas stoechas	
Alkene	<i>(E)</i> -β-caryophyllene	C15H24	204	L. angustifolia	[77, 81, 88]
				L. x intermedia abrial, grosso, super	
				L. latifolia	
				L. stoechas	
Alkene	(Z)-caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	204	L. angustifolia	[75, 122, 316,
				L. cariensis	317]
				L. latifolia	
				L stoechas stoechas	

Alkene	α-cedrene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[72, 81, 120]
Alkono	a chamigrana	CreHer	204	L. X Internieulu ubriui, grosso, super	[110]
Alkono	consono	C15H24	204	L. dentata	[110]
Alkene	copaelle	C15F124	204		
Aikene	α-copaene	C15Π24	204	L. ungustijonu	[/1, /2, 8/,
					122]
A 11	0		204		[422]
Alkene	p-copaene	C ₁₅ H ₂₄	204	L stoechas stoechas	[122]
Alkene	α-cubebene	C ₁₅ H ₂₄	204	L stoechas stoechas	[122]
Alkene	β-cubebene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. x intermedia abrial, grosso	[81, 314, 316]
				L. latifolia	
				L. stoechas	
Alkene	cuparene	C ₁₅ H ₂₂	202	L. dentata	[82]
Alkene	α-cuprenene	C ₁₅ H ₂₄	204	L cariensis	[122]
Alkene	α-curcumene	C ₁₅ H ₂₂	202	L. latifolia	[316]
Alkene	daucene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[120]
Alkene	α-elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	L stoechas	[87]
Alkene	β-elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. viridis	[89]
Alkene	γ-elemene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. stoechas	[89 <i>,</i> 118]
				L. viridis	
Alkene	farnesene	C15H24	204	L. dentata	[76, 115, 316]
				L. x intermedia	
				L. latifolia	
				L. spica	
Alkene	α-farnesene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. x intermedia abrial, grosso, super	[81, 317]
				L. latifolia	
Alkene	β-farnesene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[78, 80, 81,
	•			L. angustifolia maillette, matherone	290]
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, super	-
				L. latifolia	
Alkene	(F)-B-farnesene	C15H24	204	L. anaustifolia	[72, 73, 120,
	(-) P			L. angustifolia maillette, sher-e-kashmir	121, 128, 137.
				L x intermedia arosso sumiens super	314]
				L stoechas	011]
Alkene	(7)-B-farnesene	C15H24	204	L angustifolia	[75 81]
		C151124	207	L x intermedia abrial arosso super	[/3, 01]
Alkono	ß-funebrene	CarHoa	204	L stoechas	[21/]
AIRCHE	Prunebrene	C151124	204		[314]

Alkene	germacrene	C15H24	204	L. dentata L. lanata L. spica	[76, 318]
				L. viridis	
Alkene	germacrene A	C15H24	204	L. latifolia	[316]
Alkene	germacrene D	$C_{15}H_{24}$	204	L. angustifolia	[71–73, 78,
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	81, 120, 128,
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	290, 313]
				L stoechas stoechas	
Alkene	bicyclogermacrene	C15H24	204	L. angustifolia	[71, 72, 314]
				L. stoechas	
				L stoechas stoechas	
Alkene	guaiazulene	C ₁₅ H ₁₈	198	L. stoechas luisieri	[85]
Alkene	α-guaiene	C ₁₅ H ₂₄	204	L stoechas stoechas	[122]
Alkene	<i>cis</i> -β-guaiene	$C_{15}H_{24}$	204	L stoechas stoechas	[71]
Alkene	<i>trans</i> -β-guaiene	C15H24	204	L. viridis	[89]
Alkene	α-gurjunene	C15H24	204	L. latifolia	[80, 86]
				L. stoechas luisieri	
Alkene	γ-gurjunene	C15H24	204	L. dentata	[71, 82]
				L stoechas stoechas	
Alkene	δ-gurjunene	C15H24	204	L stoechas	[87]
Alkene	α-himachalene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[72]
Alkene	isoledene	C15H24	204	L stoechas stoechas	[71]
Alkene	ledene	C15H24	204	L. stoechas	[88]
Alkene	longifolene	C ₁₅ H ₂₄	204	L stoechas stoechas	[71, 122]
Alkene	α-muurolene	C15H24	204	L stoechas stoechas	[122]
Alkene	α-santalene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. angustifolia	[75, 81, 137]
				L. x intermedia abrial, grosso	
Alkene	selinadiene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. viridis	[76]
Alkene	selina-3,7(11)-diene	C15H24	204	L. cariensis	[87, 89, 118,
				L stoechas	122]
				L. viridis	
Alkene	selinene	C15H24	204	L. dentata	[76]
				L. spica	
				L. stoechas	
				L. viridis	
Alkene	α-selinene	C15H24	204	L. dentata	[71, 81, 318]

Alkene	β-selinene	C15H24	204	L. x intermedia abrial, grosso, super L stoechas stoechas L. angustifolia L. cariensis L. dentata L stoechas L stoechas stoechas L. viridis	[72, 87, 89, 122, 318]
Alkene	β-sesquiphellandrene	C15H24	204	L. x intermedia grosso	[81]
Alkene	7-epi-sesquithujene	C15H24	204	L. angustifolia	[72]
Alkene	valencene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. cariensis	[71, 89, 122]
				L stoechas stoechas	
				L. viridis	
Alkene	viridiflorene	C15H24	204	L. cariensis	[122]
Alkene	α-ylangene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. latifolia	[316]
Alkene	zingiberene	C ₁₅ H ₂₄	204	L. stoechas	[314]

Alcohol	a-pisabolol	C15H26O	222	L anaustifolia	[81 86 115
				L. x intermedia	120, 135, 137.
				L. x intermedia abrial, grosso, super	314, 316, 317]
				L. latifolia	
				L. stoechas	
				L. stoechas luisieri	
Alcohol	α-bisabolol oxide	C15H26O2	238	L. latifolia	[316]
Alcohol	cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	L. angustifolia sher-e-kashmir	[71, 81, 128,
				L. x intermedia abrial, grosso	316]
				L. latifolia	
				L stoechas stoechas	
Alcohol	α-cadinol	C15H26O	222	L. x intermedia grosso	[73, 86, 317]
				L. latifolia	
				L. stoechas luisieri	
Alkene	10,11-epoxycalamenene	C ₁₅ H ₂₀ O	216	L stoechas stoechas	[122]
-	caryophyllene oxide	C15H24O	220	L. angustifolia	[72, 73, 75–
				L. angustifolia maillette, matherone, sher-e-kashmir	78, 80, 81, 88,

				L. cariensis	115, 122, 125,
				L. dentata	126, 128, 290,
				L. x intermedia	314, 318]
				L. x intermedia abrial, grosso, sumian, sumiens, super	
				L. lanata	
				L. latifolia	
				L. spica	
				L. stoechas	
				L. stoechas stoechas	
				L. viridis	
-	trans-caryophyllene oxide	C15H24O	220	L. latifolia	[316]
-	epoxycaryophyllene	C15H26O	222	L. dentata	[82]
Alcohol	α-copaene-8-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	L. stoechas stoechas	[122]
Alcohol	<i>epi-</i> cubebol	C15H26O	222	L stoechas stoechas	[122]
Alcohol	cubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	L. cariensis	[122]
				L stoechas stoechas	
Alcohol	elemol	C15H26O	222	L. angustifolia	[125]
Alcohol	<i>epi</i> -α-bisabolool	C15H26O	222	L. x intermedia grosso, sumiens, super	[73]
Alcohol	<i>epi-</i> α-cadinol	C15H26O	222	L. angustifolia	[73, 125]
				L. x intermedia grosso, sumiens, super	
Alcohol	eudesma-4(15),7-dien-1 eta -ol	C15H24O	220	L. stoechas stoechas	[122]
Alcohol	α-eudesmol	C15H26O	222	L. dentata	[82]
Alcohol	β-eudesmol	C15H26O	222	L. cariensis	[118, 122,
				L. dentata	314]
				L. stoechas	
Alcohol	farnesol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	L. latifolia	[316, 317]
Alcohol	globulol	C15H26O	222	L. viridis	[126]
Ketone	juniper camphor	C ₁₅ H ₂₆ O	222	L. viridis	[126]
Alcohol	ledol	C15H26O	222	L. latifolia	[317]
Alcohol	14-oxy- α -muurolene	C15H22O	218	L. stoechas stoechas	[122]
Alcohol	muurolol	C15H26O	222	L. stoechas luisieri	[85]
Alcohol	α-muurolol	C15H26O	222	L. angustifolia	[73, 120, 122]
				L. cariensis	
				L. x intermedia sumiens	
				L. stoechas stoechas	
Alcohol	<i>epi</i> -α-muurolol	C15H26O	222	L. stoechas stoechas	[122]
Alcohol	nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	L. stoechas	[86, 314]

				L. stoechas luisieri	
Alcohol	rosifoliol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	L stoechas stoechas	[71]
Alcohol	selina-3,11-dien-6α-ol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	L. cariensis	[122]
Alcohol	spathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220	L. viridis	[126]
Alcohol	viridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O	222	L. latifolia	[71, 85, 86,
				L. stoechas luisieri	122, 126, 317]
				L stoechas stoechas	
				L. viridis	
Ester	isobornyl 3-methyl butyrate	C15H26O2	238	L. latifolia	[316]
Ester	lavandulyl isovalerate	C15H26O2	238	L. angustifolia	[73, 120]
				L. x intermedia grosso, super	
Ester	linalyl isovalerate	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	238	L. stoechas	[314]

Coumarins					
-	coumarin	C ₉ H ₆ O ₂	146	L. angustifolia L. latifolia L. intermedia super	[80, 123, 313]
-	7-methoxycoumarin (herniarin)	$C_{10}H_8O_3$	176	L. latifolia	[80]
Ector	goranyl hovanosto		253	L stoosbas	[214]
Ester	geranyi nexanoate	$C_{16}\Pi_{28}O_{2}$	252	L. SLOPCHUS	[314]
Alkane	hexadecane	$C_{16}H_{34}$	266	L. stoechas	[88]
-	linalyl anthranilate	C17H23NO2	273	L. angustifolia	[121]
Ketone	farnesyl acetone	C ₁₈ H ₃₀ O	262	L. x intermedia	[115]

Chapitre II.

Annexe 2. Mass-to-charge ratio (m/z) of unidentified VOCs detected by HS-SPME GC-MS (60 min, 70°C, DVB/CAR/PDMS fiber) in grosso L. x intermedia roots.

LRI (calc.)			Area (% ± SD)				
		m/z	Ground roots	Intact roots			
NI-1	1052	106 (100), 77 (96), 51 (40), 74 (9), 63 (3), 41 (2), 57 (2), 91 (2), 133 (1), 70 (1)	0.2 ± 0.1	0.2			
NI-2	1053	105 (29), 77 (95), 97 (58), 51 (40), 135 (32), 91 (14), 119 (14), 63 (6), 41 (6)	-	0.3			
NI-3	1058	55 (100), 70 (87), 43 (27), 97 (18), 83 (11), 111 (3), 133 (2), 122 (2)	0.1	-			
NI-4	1062	81 (100), 41 (23), 93 (21), 138 (18), 69 (17), 53 (16), 65 (7), 105 (5), 109 (3), 120 (3)	-	0.2			
NI-5	1106	119 (100), 91 (94), 134 (93), 105 (34), 41 (32), 77 (29), 57 (15), 65 (13), 81 (7)	-	0.8 ± 0.1			
NI-6	1121	126 (100), 81 (74), 93 (59), 108 (56), 41 (38), 67 (27), 55 (20), 152 (7)	-	0.2			
NI-7	1127	91 (100), 134 (86), 119 (44), 41 (22), 77 (18), 105 (18), 126 (17), 65 (15)	-	0.4 ± 0.1			
NI-8	1193	84 (100), 41 (18), 69 (13), 56 (11), 91 (11), 108 (9), 77 (7), 119 (6), 134 (5), 152 (2)	1.2 ± 0.5	1.3 ± 0.1			
NI-9	1258	73 (100), 41 (40), 57 (20), 109 (12), 95 (10), 126 (8), 148 (4)	-	0.3			
NI-10	1265	133 (100), 73 (83), 43 (49), 57 (47), 81 (35), 105 (30), 148 (27), 123 (11)	0.2	0.2			
NI-11	1313	81 (100), 43 (79), 121 (73), 97 (49), 55 (43), 69 (39), 109 (37), 137 (27), 155 (23), 162 (5)	-	0.3 ± 0.1			
NI-12	1315	133 (100), 105 (40), 77 (24), 43 (22), 148 (21), 51 (17), 121 (8), 97 (6), 57 (5)	-	0.2 ± 0.1			
NI-13	1342	81 (100), 43 (21), 69 (16), 55 (11), 109 (8), 95 (7), 121 (6), 137 (4), 152 (2)	-	0.6 ± 0.1			
NI-14	1363	136 (100), 108 (60), 168 (46), 73 (13), 60 (12), 55 (10), 41 (10), 129 (7), 91 (3), 121 (2)	0.1	0.5 ± 0.1			
NI-15	1369	111 (100), 43 (33), 55 (25), 125 (25), 81 (20), 67 (17), 95 (16), 155 (9), 137 (9), 161 (4)	-	0.2			
NI-16	1379	93 (100), 108 (79), 73 (73), 123 (22), 151 (21), 55 (21), 41 (20), 136 (8)	-	0.4 ± 0.1			
NI-17	1390	57 (100), 43 (82), 82 (63), 69 (49), 110 (16), 140 (16), 98 (8), 156 (6)	-	0.4			
NI-18	1798	57 (100), 71 (90), 113 (53), 43 (37), 143 (17), 83 (9), 124 (8), 98 (6), 105 (4), 97 (4)	-	0.2 ± 0.1			
NI-19	1805	176 (100), 91 (82), 218 (68), 79 (65), 133 (63), 161 (55), 41 (47), 147 (43), 203 (30)	0.1	-			
NI-20	1821	105 (100), 91 (50), 77 (34), 212 (26), 51 (12), 194 (10), 63 (3), 44 (2), 165 (2), 223 (1)	-	0.3			
NI-21	1399	73 (100), 152 (28), 81 (9), 53 (6), 133 (5)	tr.	tr.			
NI-22	1124	133 (100), 151 (74), 77 (12), 207 (10), 68 (5), 105 (4), 117 (3), 45 (3), 63 (2), 91 (1)	0.1	0.2			
Area expressed as a percentage of the total GC area.							
LRI (calc.), Linear Retention Index calculated according to the retention times of standard n-alkane C ₆ -C ₂₄ mixture.							
m/z, mass-to-charge ratio (relative abundance, the most intense ion is assigned an abundance of 100).							
133, molecular weight.							
-, absent.							
SD, standard deviation.							



Annexe 3. PLS-DA score plot of compounds emitted by ground fine lavender and lavandin root varieties. The inter-variance explained by the two components is 68%.

Annexe 4. Paramètres des analyses GC-MS/FID réalisées sur les racines de lavandin grosso

Les composés volatils émis par les racines dans le sol ont été analysés en GC-MS en utilisant le système Agilent 6890 couplé à un détecteur de masse Agilent 5973. Une colonne apolaire HP-1 (Agilent, 50 m x 200 µm, 0,33 µm) a été utilisée avec l'hélium comme gaz vecteur (débit constant de 1 mL/min). Les injections ont été réalisées en splitless (ouverture de la vanne de split au bout de 4 min) avec une température de l'injecteur fixée à 250°C. La température du four a été programmée à 50°C pendant 2 min et ensuite augmentée de 50°C à 180°C (2°C/min), puis de 180°C à 250°C (15°C/min) et pour finir, stabilisée pendant 10 min à 250°C. Des analyses en GC-FID ont été réalisées pour quantifier les COVs émis par les parties racinaires in situ. Hormis l'utilisation d'azote comme gaz vecteur en GC-FID, les analyses ont été réalisées selon les mêmes conditions et le même appareillage que pour les analyses en

Annexe 5. Paramètres des analyses ATD-GC-MS réalisées sur les racines de lavandin grosso

GC-MS (instrument et colonne identiques).

Les composés volatils piégés ont été thermodésorbés à l'aide d'un désorbeur thermique automatique ATD 350 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Le principe repose sur une désorption intégrale à l'aide de hautes températures sous flux d'hélium. Ainsi, les composés volatils ont été désorbés pendant 15 minutes à 300°C sous un flux d'hélium de 50 mL /min (désorption primaire) qui permet le passage des composés du tube à la chambre à l'aide d'une vanne multivoies. Les composés sont ensuite concentrés sur un polymère à -30°C présent dans la chambre, puis chauffés jusqu'à 300°C en 40°C/min, température maintenue 10 minutes pour décrocher les composés. Les composés thermodésorbés ont été transférés à la colonne du GC Clarus 680 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) en mode splitless à travers une ligne de transfert chauffée à 300°C (100% d'échantillon injecté). L'ATD 350 est relié au GC Clarus 680 couplé à un détecteur de masse MS Clarus SQ8T (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Une colonne ELITE-5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) a été utilisée avec l'hélium comme gaz vecteur (débit constant de 1 mL/min). La température du four a été programmée à 50°C pendant 2 min et ensuite augmentée de 50°C à 180°C (2°C/min), puis de 180°C à 250°C (15°C/min) et pour finir, stabilisée pendant 10 min à 250°C.
Chapitre III.

Annexe 6. Liste du matériel nécessaire	pour réaliser le dispositif DHS six voies.

Fournisseur	Matériel	Quantité	Utilisation
	Débitmètres Supelco Rotameter 23326	12	Régler les flux d'air
SIGIVIA-ALDRICH	Filtres à charbon actif ORBO 32 small 20267-U	6	Purifier l'air
-	Fabrication d'un gros filtre à partir d'une colonne dans laquelle du charbon actif y est inséré	1	Purifier l'air
LEROY MERLIN	Faces plexiglass pour former le cube - 61755302	1 plaque 100*100 découpée en	Structure de fixation
		carré de 28,5*28,5cm	
	Scotch téflon - 70767753	1	-
FISHER	Raccords en PTFE	24	Fixer les débitmètres au cadre
KNF	Pompe N86 KNDC 12V	1 soufflante, 1 aspirante	Générer les flux d'air
	Batterie 12V 12Ah YUASA NP12-12 Code commande RS 597-841	2	-
rs-online.com	Tuyaux en plastique mou avec diamètre intérieur 5-6mm Code commande RS 797-344	2 x 25m	Permettre à l'air de circuler dans le dispositif
LEROY MERLIN	Chargeur batterie - 77799190	1	-
еВау	Répartiteur métal 6 sorties	2	Faire les liaisons entre les débitmètres
Simaco	Rôti-bulle en NALOPHAN incolore 150 – 8m	5 paquets de 150cm x 8m	Créer une enceinte autour des inflorescences

I PL (colc.)	m/z	Area 7713	3 (% ± SD) ^[a]	Area <i>abrial</i> (% ± SD) ^[a]	
LRI (Calc.)	111/2	(A)	(S)	(A)	(S)
965	41,80 42,4 43,42 50,4 51,44 52,16 53,55 55,25 57,6 63,13 65,54 66,11 67,34 68,6 69,60 77,321 78,50 79,244 80,90 81,12 91,448 92,100 93,1000 94,116 95,2 105,20 107,18 115,3 119,16 121,47 136,100 137,4	-	-	0.04 ± 0.1	-
1019	42,13 43,38 50,28 51,46 52,35 53,32 54,0 55,1 56,13 57,135 59,5 63,35 64,21 65,234 66,26 67,39 68,42 77,170 78,60 79,105 82,16 84,1 87,6 89,50 91,978 92,63 93,121 94,7 101,5 103,140 104,29 105,37 106,0 107,5 115,162 116,17 117,354 118,68 120,328 121,10 132,6 134,1000 135,47	-	-	0.46 ± 0.33	0.35 ± 0.25
1025	43,1000 44,12 45,10 54,26 55,34 56,67 58,94 59,77 60,3 69,198 70,31 71,410 72,24 81,76 82,46 83,140 84,446 85,48 96,228 97,65 98,12 108,314 109,59 110,6 111,350 112,31 125,16 126,36 139,249 140,20 154,261 155,36	-	-	1.50 ± 4.50	0.19 ± 0.51
1110	41,69 42,129 43,280 44,8 51,5 53,11 54,9 55,204 56,499 57,1000 58,35 67,23 68,5 69,155 70,10 71,35 72,13 76,12 77,9 79,1 80,10 82,1 83,31 84,187 85,20 87,46 91,9 92,8 93,26 94,6 99,11 101,6 105,1 107,1 121,1 129,6 136,1	-	-	0.12 ± 0.05	0.12 ± 0.05
1379	41,120 42,30 43,266 45,5 50,1 51,14 52,7 53,91 54,7 55,98 57,22 60,6 63,6 65,45 66,14 67,139 68,186 69,693 70,28 71,1 77,84 78,16 79,67 80,70 81,49 82,22 83,20 84,16 85,31 91,191 92,49 93,1000 94,29 95,15 103,8 104,1 105,32 106,29 107,72 108,9 115,1 117,8 118,1 119,5 120,40 121,71 122,6 123,5 131,1 132,1 133,29 134,11 136,44 137,1 161,7	0.19 ± 0.27	0.17 ± 0.1	0.05 ± 0.06	0.08 ± 0.08
1395	41,131 42,24 43,36 44,1 51,25 52,5 53,61 54,11 55,163 56,131 57,27 63,5 65,54 66,6 67,62 68,16 69,300 70,50 77,252 78,43 79,125 80,23 81,25 82,23 83,14 84,12 91,436 92,177 93,1000 94,86 95,43 97,11 103,19 105,175 106,33 107,67 108,10 109,39 115,15 117,24 118,11 119,925 120,169 121,78 122,14 131,10 132,13 133,33 134,14 136,1 145,1 159,6 161,57 162,8 189,13 204,8	-	-	0.1 ± 0.07	0.11 ± 0.11
1406	41,120 42,30 43,266 45,5 50,1 51,14 52,7 53,91 54,7 55,98 57,22 60,6 63,6 65,45 66,14 41,84 43,56 44,4 51,16 53,112 54,8 55,224 57,18 63,4 66,14 67,70 68,10 69,170 70,10 77,228 79,5 80,41 81,32 82,10 83,15 91,446 93,1000 97,4 103,12 104,8 105,282 106,32 107,371 108,54 109,42 117,10 119,3 122,34 123,12 131,5 133,58 134,30 135,62 136,10 137,24 162,8 176,33 189,66 204,42 205,6	0.04 ± 0.08	0.02 ± 0.05	0.91 ± 0.31	0.77 ± 0.27
1446	42,32 43,28 51,20 52,7 53,144 55,109 63,2 65,34 66,10 67,222 68,22 69,1000 70,49 71,10 77,132 79,55 81,84 83,4 92,157 93,630 95,68 96,5 97,3 105,43 107,52 108,8 110,6 111,3 112,7 119,144 121,8 122,8 123,4 128,4 129,5 131,8 133,285 135,10 159,6 161,144 163,3 175,2 189,9	0.15 ± 0.33	0.02 ± 0.05	0.19 ± 0.18	0.15 ± 0.13

Annexe 7. Mass-to-charge ratio (m/z) of unidentified VOCs detected by DHS (60 min, Tenax TA) ATD-GC-MS on asymptomatic and symptomatic plants.

Annexes

1471	41,261 42,37 43,57 51,28 52,17 53,116 54,15 55,224 56,24 57,93 63,7 65,74 66,19 67,200 68,79 69,1000 70,53 71,70 77,223 78,46 79,299 80,40 81,204 82,93 83,19 84,6 91,369 92,175 93,654 94,107 95,82 96,6 103,16 104,7 105,184 106,41 107,134 108,20 109,111 110,9 111,10 112,11 115,19 116,1 117,36 118,14 119,234 120,267 121,68 122,15 123,9 128,5 129,6 131,37 132,91 133,351 134,70 135,35 136,6 145,31 146,5 159,10 160,7 161,224 162,28 175,1 189,17 202,17 204,42	- 0.05 ± 0.07	0.08 ± 0.08
^[a] Area exp (A), asymp LRI (calc.), m/z, mass In bold, m SD, standa -, absent.	pressed as a percentage of the total GC area. ptomatic. (S), symptomatic. Linear Retention Index calculated according to the retention times of standard n-alkane C ₆ -C ₂₄ mixture. -to-charge ratio (relative abundance, the most intense ion is assigned an abundance of 1000). olecular weight. ard deviation.		

(A)										
name	statut	pcr	level	dry mass (g)	6.2351	6.728	11.7709	16.8226	17.5249	17.6638
ES_77131	S	Н	3	7.2855	0	0	0	0	0.06559648	0.16672166
ES_77133	S	Н	3	10.1831	0.36778837	0.13301722	0	0.06508141	0	0.05953651
ES_77134	S	1	3	2.9018	0.47463768	0.14041166	0	0.03726415	0.1844427	0.2058939
ES_77135	S	Н	3	3.117	0.35861512	0.1020519	0	0.0646924	0.02016464	0.06916534
ES_77136	S	Н	3	2.2665	0	0	0	4.52E-04	0	0.02996726
ES_77137	S	Н	3	1.9064	0.44219012	0.12092226	0	0.10214321	0.1888729	0.2065617
ES_77138	S	1	3	1.9699	0.24805875	0.06457977	0	0.06277667	0.04801482	0.0529218
ES_77139	S	Н	3	2.2523	0.32830724	0.13297307	0	0.05672505	0.15484304	0.17082289
ES_771310	А	Н	1	9.0279	0.82837663	0.53069594	0.07392716	0	0.52507373	0.63619246
ES_77131	А	Н	1	7.6356	0	0	0	0	0.14312327	0.07807006
ES_77132	А	Н	1	8.1664	0	0	0	0.07716808	0.28353495	0.23958576
ES_77135	А	Н	1	8.9555	0.6709427	0.59105995	0.07190021	0.08597432	0.40390799	1.04945383
ES_77137	А	Н	1	6.1268	0	0	0	0	0	0.12556728
ES_77138	А	Н	1	6.256	0	0	0	7.58E-04	0	0.05660931
(B)										
name	status	pcr	level	dry mass (g)	6.7458	8.3434	16.8167	17.5133	17.8672	19.4593
ES_AB10	S	Н	3	3.2794	0.08858076	0	0	0.16452307	0.01571555	0
ES_AB1	S	Н	1	9.2833	0.14796478	0	0	0.14437629	0.01566461	0
ES_AB2	S	1	2	12.9311	0.23623076	0	0	0	0.02065037	0
ES_AB3	S	Н	3	6.8251	0.26080223	0	0	0.34519607	0.02092868	0
ES_AB4	S	Н	3	5.0244	0.19955691	0	0	0.26725041	0.01432155	0.00450111
ES_AB5	S	Н	3	5.5432	0.20975764	0.13907651	0.086101	0.50298464	0.02298228	0
ES_AB6	S	Н	2	5.2218	0.1189453	0	0	0.47148967	0.01835971	0
ES_AB7	S	Н	2	5.8903	0.16706289	0	0	0.29305976	0.02089772	0

Annexe 8. Examples of matrices from 7713 fine lavender (A) and *abrial* (AB) lavandin (B) (S: symptomatic; A: asymptomatic; H: healthy; I: infected).

ES_AB8	S	I	2	4.6622	0.2712444	0.04862522	0.05863943	1.00787861	0.02071905	0
ES_AB9	S	1	2	5.0187	0.22414186	0	0	0.6996983	0.0205659	0
ES_AB10	А	Н	1	5.7166	0	0	0	0	0.01043206	0
ES_AB1	А	Н	1	12.1602	0.1174758	0.11851746	0	1.59000248	0.02471249	0
ES_AB2	А	Н	1	8.9329	0.16654992	0.06755734	0	0.2452812	0.02036368	0
ES_AB3	А	Н	1	6.0662	0	0	0	0.22176102	0.01624225	0
ES_AB4	А	Н	1	5.1104	0.0584931	0.32954608	0	0.31975397	0.01738955	0
ES_AB5	А	Н	1	5.9958	0.06314841	0.26842201	0	0.31460332	0.01338489	0.0569595
ES_AB6	А	Н	1	6.4925	0.08302541	0.16455431	0	0.20112759	0.01774431	0
ES_AB7	А	Н	1	9.722	0	0	0	0	0.01878986	0
ES_AB8	А	Н	1	8.193	0.23145608	0	0	0.22439807	0.01900573	0
ES_AB9	А	Н	1	9.9	0.39042642	0	0	0.8962905	0.02430504	0

(A) 7713 fine lavender		(B) <i>abrial</i> lavandin		
VIP score	Compound	VIP score	Compound	
1.542	<i>(E)</i> -β-farnesene	1.546	(Z)-3-hexen-1-ol acetate	
1.485	lavandulyl acetate	1.513	lavandulyl acetate	
1.479	hexyl acetate	1.372	<i>(E)</i> -β-farnesene	
1.402	terpinen-4-ol	1.278	<i>(Z)</i> -β-ocimene	
1.39	linalyl acetate	1.249	hexyl acetate	
1.036	linalool	1.239	<i>(E)</i> -β-ocimene	
1.031	3-octanol, acetate	1.23	terpinolene	
0.967	allo-ocimene	1.227	allo-ocimene	
0.964	β -caryophyllene	1.204	germacrene D	
0.963	limonene	1.092	β-pinene	
0.961	<i>(Z)</i> -β-ocimene	1.066	<i>trans</i> -α-bergamotene	
0.911	1,8-cineole	1.063	1,8-cineole	
0.909	β -myrcene	1.035	linalool	
0.854	<i>(E)</i> -β-ocimene	1.012	β-caryophyllene	
0.839	1-octen-3-yl acetate	0.781	α -santalene	
0.691	o-cymene	0.746	limonene	
0.688	α -terpinene	0.678	linalyle acetate	
0.587	m-cymene	0.629	NI_1019	
0.552	3-octanone	0.552	bornyl formate	
0.213	(Z)-3-hexen-1-ol acetate	0.545	p-cymene	
		0.52	camphor	
		0.497	γ-cadinene	
		0.42	o-cymene	

Annexe 9. Identity of the VIP score metabolites that discriminate *7713* fine lavender (A) and *abrial* lavandin (B) depending on asymptomatic to symptomatic stages.

Chapitre IV.

Annexe 10. Mass-to-charge ratio (m/z) of unidentified stored VOCs from symptomatic and symptomatic 7713 fine lavender and *abrial* lavandin and detected by GC-MS.

NI	LRI (calc.)	m/z
NI-1	1002	38 (0.7), 39 (10), 41 (6.5), 42 (3.8), 50 (2.5), 53 (2.9), 54 (2), 55 (21.6), 56 (12.3), 65 (1.6), 66 (1.2), 67 (4.2), 70 (1), 71 (14.6), 72 (1.1), 83 (5.9), 98 (17.4), 99 (6.7), 111 (100), 112 (4), 126 (7.2)
NI-2	1333	39 (6.8), 40 (1.6), 41 (14.7), 42 (3), 43 (64), 44 (1.7), 45 (2.5), 51 (1.2), 53 (5.8), 54 (2.2), 55 (18.7), 56 (2.2), 65 (2.9), 66 (1.2), 67 (36.9), 68 (10.1), 69 (4.2), 70 (1.4), 71 (66), 72 (3.2), 77 (2.1), 79 (4.7), 80 (1.8), 81 (8.6), 82 (100), 83 (67.1), 84 (7), 85 (47.2), 86 (2.6), 87 (1.5), 91 (1.6), 93 (1.8), 94 (3), 95 (2.2), 99 (3.7), 102 (2.8), 107 (2.3), 108 (1.4), 109 (11.5), 110 (1.4)
NI-3	1382	39 (14.6), 40 (3.1), 41 (46.6), 42 (4.1), 43 (71.6), 44 (2.2), 45 (2.3), 51 (1.8), 52 (1.1), 53 (7.3), 54 (1.6), 55 (11.6), 56 (1.3), 57 (1.5), 60 (1.5), 65 (2.7), 66 (1.6), 67 (18.7), 68 (2.5), 69 (100), 70 (6.3), 71 (39.9), 72 (2.3), 77 (3.5), 79 (12.5), 80 (4.8), 81 (27.1), 82 (5.1), 83 (8.1), 84 (25.7), 85 (7.1), 91 (3.5), 92 (1.3), 93 (6.7), 94 (4), 95 (6.1), 96 (2), 97 (10.4), 98 (4.3), 99 (1.8), 105 (1.7), 106 (2.5), 107 (10.3), 108 (6.4), 109 (8.7), 110 (2.1), 111 (1.6), 112 (2.4), 113 (4.4), 117 (1.2), 121 (2.9), 122 (9.1), 123 (11.7), 124 (5.6), 125 (3.8), 126 (4.3), 127 (6.6), 135 (35.3), 136 (3.6), 140 (1.2), 141 (3.3), 150 (8.8), 151 (13.6), 152 (1.5), 153 (6.8), 167 (2.2), 168 (1.8)
NI-4	1421	39 (6.5), 40 (1.6), 41 (31.5), 42 (1.6), 43 (6.5), 51 (2.5), 53 (7.6), 54 (1), 55 (14.6), 56 (1.1), 57 (1.7), 65 (5.6), 66 (2.5), 67 (11.2), 68 (2.7), 69 (28.1), 70 (2), 71 (1.1), 77 (19.1), 78 (4), 79 (24.6), 80 (4.1), 81 (6.3), 82 (3.8), 83 (2.6), 91 (31.9), 92 (6.8), 93 (88.9), 94 (100), 95 (50.7), 96 (5.2), 97 (1.4) 103 (3.9), 104 (1.4), 105 (23.7), 106 (6.7), 107 (35.9), 108 (14.1), 109 (11.2), 110 (1.8), 115 (2.5), 116 (9), 117 (3.7), 118 (1.9), 119 (18.1), 120 (12.7), 121 (30.9), 122 (22), 123 (3.7), 133 (7.1), 134 (5.8), 135 (7.1), 136 (3.4), 137 (6.3), 161 (12.3), 162 (2), 175 (1.5), 176 (5.9), 189 (19.7), 190 (3.7), 204 (18.5), 205 (3.7)
NI-5	1493	39 (3.5), 41 (8.7), 42 (1.5), 43 (100), 44 (1.7), 45 (1.7), 51 (1.8), 53 (2.9), 59 (8.1), 60 (1.6), 65 (1.5), 67 (4.8), 68 (10.5), 71 (5.4), 72 (1.5), 77 (1.6), 79 (7.3), 81 (14.8), 83 (3.8), 84 (1.5), 91 (6.2), 92 (2.4), 93 (9.3), 94 (3.5), 95 (5.1), 105 (1.5), 107 (3.5), 109 (4.8), 110 (1.7), 111 (1.6), 113 (5.9), 119 (2.2), 126 (1.3), 127 (1.4), 135 (7.4), 136 (2.3), 137 (4.4), 153 (1.2), 155 (1.2)
NI-6	1576	39 (2.6), 41 (8.4), 42 (1.4), 43 (100), 44 (2.2), 45 (1.9), 53 (2.6), 55 (8.2), 57 (1), 58 (1.8), 59 (21.4), 60 (22), 65 (1.3), 66 (1), 67 (5.5), 68 (22), 69 (5), 70 (1.4), 71 (12.8), 72 (6.3), 77 (2.2), 79 (13), 80 (1.9), 81 (12.7), 82 (4.7), 83 (3.2), 84 (3.5), 85 (2.2), 86 (1.5), 87 (1), 91 (3.2), 93 (15.1), 94 (29.2), 95 (5.9), 96 (1.6), 97 (3.2), 99 (2.6), 101 (12.1), 102 (1), 103 (2.2), 105 (2.1), 107 (1.5), 108 (1.2), 109 (9.7), 110 (2.2), 111 (4.4), 112 (3), 113 (1.9), 114 (4.4), 119 (7.2), 121 (2.7), 123 (1.4), 126 (2.3), 134 (2.3), 135 (1.5), 136 (1.5), 137 (6.9), 138 (1), 143 (1), 152 (4.4), 154 (1.1), 155 (1), 159 (1.1), 160 (1), 169 (1.3), 195 (1.2)
LRI (calc.), m/z, mass In bold , m	Linear R -to-charg	etention Index calculated according to the retention times of standard n-alkane C ₆ -C ₂₄ mixture. ge ratio (relative abundance, the most intense ion is assigned an abundance of 100). weight.

Annexe 11. Principal component analysis (PCA) score plots of stored VOCs from leaf 7713 fine lavender (A) depending on plant levels of infection and the associated partial least squaresdiscriminate analysis (PLS-DA) (B). (1), plants without symptoms (green); (3), plants having almost no floral stems, but with some leaves (red).



Annexe 12. PLS-DA plots of stored VOCs from *abrial* lavandin leaves depending on plant levels of infection. (1), plants without symptoms (green); (2), plants slightly yellowing, with fewer floral scapes (orange).



Annexe 13. Méthode d'analyse en GC-MS pour séparer les diastéréosimères du farnésène.

Les composés volatils stockés dans les extraits hexaniques ont été analysés en GC-FID en utilisant le système Agilent 6890 muni d'un détecteur à ionisation de flamme Agilent 6890. Une colonne chirale Lipodex E (Macherey-Nagel, 25 m x 0,25 mm) a été utilisée avec l'azote comme gaz vecteur (débit constant de 1 mL/min). Les injections ont été réalisées en mode split 1/100 avec une température de l'injecteur fixée à 230°C. La température du four a été programmée à 65°C pendant 10 min et ensuite augmentée de 65°C à 85°C (2°C/min), puis de 85°C à 130°C (0,5°C/min), de 130 à 210°C (10°C/min) et pour finir, stabilisée pendant 5 min à 210°C. Le standard de farnésène a été injecté à une concentration de 1 mg/mL dans du dichlorométhane (DCM) distillé.

Annexe 14. Méthode d'extraction par SPME et d'analyse en GC-MS pour séparer les énantiomères de linalol et acétate de linalyle.

Les composés volatils présents dans une HE de lavande ainsi que des standards de linalol (Sigma-Aldrich) et d'acétate de linalyle, préparés à 2 mg/mL dans du DCM distillé, ont été analysés en GC-FID en utilisant le système Agilent 6890 muni d'un détecteur à ionisation de flamme Agilent 6890. Les injections ont été réalisées manuellement soit après extraction SPME de 30 minutes sur 5 μ L d'HE dans un vial en espace de tête, soit par injection liquide (1 μ L) pour les standards. Une colonne chirale Lipodex E (Macherey-Nagel, 25 m x 0,25 mm) a été utilisée avec l'azote comme gaz vecteur (débit constant de 1,5 mL/min). Les injections ont été réalisées en mode split 1/100 avec une température de l'injecteur fixée à 230°C. La température du four a été programmée de 40 à 65°C (0,5°C/min), stabilisée 10 min à 65°C, puis augmentée de 65°C à 100°C (1°C/min), et pour finir de 100 à 210°C (4°C/min).

Chapitre V.

Annexe 15. Log-abundances of β -phellandrene, 1,8-cineole, linalyl acetate, fenchyl acetate and β caryophyllene compounds detected by HS-SPME GC-MS (DVB/PDMS fiber) (A) or NT GC-MS (B), as a function of time for the extraction of the diva lavender. Standard deviations are represented and calculated from a triplicate analysis. The extraction was carried out with SPME fiber (A) or NT device (B) at six different extraction times: 0.5, 1, 5, 10, 20 and 30 minutes. The abundance of most of the trapped compounds increases up to 10 minutes of extraction for the two methods used (NT and SPME) and then stabilise.



Annexe 16. Effect of extraction method on the mean peak area (bars) and the mean number of compounds (\pm SD) above the bars. The NT extraction method seems to trap compounds in greater abundance compared to SPME extractions.



Annexe 17. Prétraitement des données de GC-MS

Après analyses des échantillons en GC-MS, les données brutes ont été converties en format universel NetCDF soit par le logiciel DataBridge[™] (données issues des analyses en ATD-GC-MS, appareil Perkin) ou directement par le logiciel d'analyse Chemstation (données issues des analyses en GC-MS/FID, appareils Agilent).

La plateforme en ligne Workflow4metabolomics (W4M) ainsi que le logiciel R ont été utilisés dans notre étude sur les COVs dans le but d'obtenir une matrice dont les lignes correspondent aux variables caractérisées par un temps de rétention et les colonnes représentent l'abondance des pics chromatographiques de chaque variable dans un échantillon donné. Suivant les données, différents prétraitements ont été réalisés :

• Cas des études sur les COVs racinaires

- Alignement sur la plateforme en ligne Workflow4Metabolomics (W4M) (fonction *metaMS.runGC*) [183, 240]. Les données des échantillons (en NetCDF) doivent être compressées en .zip pour être téléchargé sur la plateforme. Les paramètres d'alignement utilisés sur le dossier compressé sont les suivant : largeur à mi-hauteur (FWHM : full width at half maximum) fixée à 5 ; tolérance de temps de rétention de 0,05 min (RT_Diff) ; 5 ions minimum dans un spectre de masse pour le considérer comme une molécule (Min_Features) ; valeur seuil de similarité de 0,7, soit 70% de correspondance pour l'affectation à un même spectre (similarity_threshold) ; fraction d'échantillons fixée à 0,7 et dans laquelle un spectre est présent avant qu'il ne soit considéré comme inconnu (min.class.fract) ; et un effectif minimum de 3 échantillons dans lesquels un spectre est présent avant qu'il ne soit considéré comme inconnu (min.class.size).
- 2) Normalisation des variables en rapportant les données des échantillons à l'abondance totale des composés par échantillon
- 2^e normalisation des variables : les données ont été transformées par « normalisation logarithmique » (fontion *clr*, package Hotelling sur R) pour rendre les valeurs des abondances en métabolites comparables suivant les différents composés.

• Cas pour les autres études

 Alignement réalisé sur R, package eRah [258]. Les données des échantillons (en NetCDF) doivent être classés en dossiers (1 dossier = 1 échantillon). Les m/z suivants 73, 74, 75, 147, 148, 149, 207 et 208 ont été exclus du traitement des données, car ces signaux correspondent principalement à des dérivés siloxanes. Les paramètres pour la déconvolution ont été définis pour chaque étude. Le nombre minimal d'échantillons a été fixé à 3 pour l'étape de récupération de composés manquants.

Script de traitement des données GC-MS sous eRah (R) – paramètres aléatoires

Sélectionner l'endroit où sont stockés les données : File/Select a folder/Set as working directory

Etape 1 : création du tableau

library(erah)

création des fichiers annexes createdt("matricededonnées")

ex<-newExp(instrumental="matricededonnées_inst.csv", phenotype = "matricededonnées _pheno.csv", info="Aia experiment")

Etape 2 : Déconvolution des composés

ex.dec.par<- setDecPar(min.peak.width = 2.5, min.peak.height=2500, noise.threshold=500, avoid.processing.mz=c(73:75,147:149,207:208)) ex1<-deconvolveComp(ex, ex.dec.par)</pre>

Etape 3 : Alignement des composés

ex.al.par<-setAlPar(min.spectra.cor=0.90, max.time.dist=20, mz.range=40:500) ex2<-alignComp(ex1, alParameters=ex.al.par)

Etape 4 : récupération des composés manquants
ex3 <-recMissComp(ex2, min.samples=3)</pre>

Etape 5 : Résultats

write.csv(x = ex3@Results@Alignment, file = "matricefinale.csv")

- 2) Normalisation des variables en rapportant les données des échantillons à leur masse sèche respective ou à l'abondance totale des composés par échantillon
- 3) Normalisation des variables en rapportant les données des échantillons au rapport : (abondance de standard interne pour chaque échantillon) / (abondance maximale obtenue pour le standard interne), uniquement réalisé pour les extraits hexaniques
- 4) « Normalisation logarithmique » (cf. point précédent sur les racines)

Les matrices finales obtenues après normalisation, contiennent les abondances normalisées des échantillons en lignes en fonction des temps de rétention des molécules en colonnes. Ces matrices converties en format .csv ont été utilisées pour les analyses statistiques multivariées.

Annexe 18. Analyses statistiques

Dans ce projet, deux méthodes multivariées ont principalement été utilisées : l'analyse en composantes principales (ACP), analyse non supervisée, et l'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA), analyse supervisée.

ACP : analyse en composantes principales

Script PCA simplifié utilisé sur R

```
# Sélectionner l'endroit où sont stockés les données : File/Select a folder/Set as working
directory
t <- read.csv("matrice.csv", h=T, sep=";", dec=",") #chargement de la matrice
X <- t[,5:length(t)] #matrice sans les 5 colonnes informatives
#visualiser l'ACP
library(ade4)
library(factoextra)
pca <- dudi.pca(X, scannf=F, nf=2)</pre>
etat <- t$etat
fviz_pca_ind(pca,col.ind = etat, palette = c("red","black"),
  addEllipses = T, # Ellipses de concentrations
  ellipse.type = "confidence",
  legend.title = "stage",
  label=t$nom,
  labelsize=2,
  repel = F)
```

PLS-DA : analyse discriminante par les moindres carrés partiels

Script PLS-DA simplifié utilisé sur R

Sélectionner l'endroit où sont stockés les données : File/Select a folder/Set as working directory

t <- read.csv("matrice.csv", h=T, sep=";", dec=",") #chargement de la matrice X <- t[,5:length(t)] #matrice sans les 5 colonnes informatives</pre>

répartition des échantillons suivant Y
library(mixOmics)
p <- PLS-DA(X,Y)
s.class(p\$variates\$X,fac=Y,col=c("black","red"), cstar=0, clab=1)</pre>

évaluation du modèle
MVA.cmv(X,Y, model="PLS-DA", crit.inn="NMC")
MVA.test(X,Y,model="PLS-DA", cmv=TRUE,ncomp=4,progress=FALSE,kout = 3, kinn = 2, scale
= TRUE)

obtention des VIP score
vip <- PLS-DA.VIP(p, graph=T)</pre>