

Compte-rendu de travaux pratique :

*Initiation aux mesures de croissance fongique, de résistance aux antifongiques
et aux techniques d'identification de champignons*

I- Introduction:

Les plantes sont des organismes sessiles, celles-ci doivent par conséquent faire face à de nombreux stress ayant une origine abiotique ou biotique. Parmi ce second type de stress, il y a notamment les attaques fongiques.

Alternaria brassicicola est un bon exemple de ces champignons pathogènes des plantes. Celui-ci s'attaque spécifiquement aux plantes de la famille des Brassicaceae qui contient de nombreuses espèces cultivées tel que le colza ou le chou. Cet Ascomycète de type nécrotrophe est transmissible par les semences et est responsable de la maladie des « taches noires » présente à tous les stades de développement de la plante, de la levée à la récolte. Selon l'organe atteint, la maladie peut conduire à des manques à la levée et des fontes de semis, au rejet des produits destinés à l'alimentation, à une diminution de la quantité et de la qualité des semences récoltées, entraînant ainsi des pertes économiques considérables.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'étude de deux souches d'*Alternaria brassicicola*, qui sont ABRA et 20M. Les deux objectifs étaient d'une part de comparer la sensibilité de ces souches à un fongicide nommé Iprodione et d'autre part d'analyser leur pouvoir pathogène sur le chou.

Pour étudier la sensibilité de ces souches à un fongicide, nous avons étudié via deux expériences, la croissance de ces pathogènes à différentes concentrations en Iprodione. La première consistait à analyser la croissance radicale de ce champignon sur boîte de pétri. La seconde expérience consistait à analyser sa croissance en milieu liquide via une étude néphélométrique.

Enfin, pour comparer le pouvoir pathogène de ces deux souches sur le chou, nous avons inoculé une quantité variable de spore de ce champignon sur feuille puis observé les symptômes.

II- Matériels et méthodes:

Partie 1: Sensibilité au fongicide

A) Etude de la croissance radiale

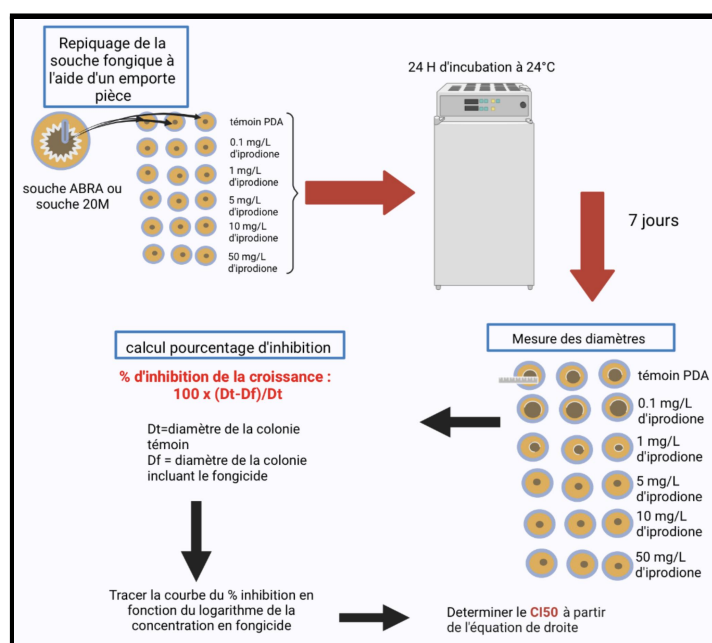


Figure 1: Protocole d'analyse de la croissance radiale de souche de champignon sur des milieux PDA contenant différentes concentrations de fongicides

B) Etude néphélométrique

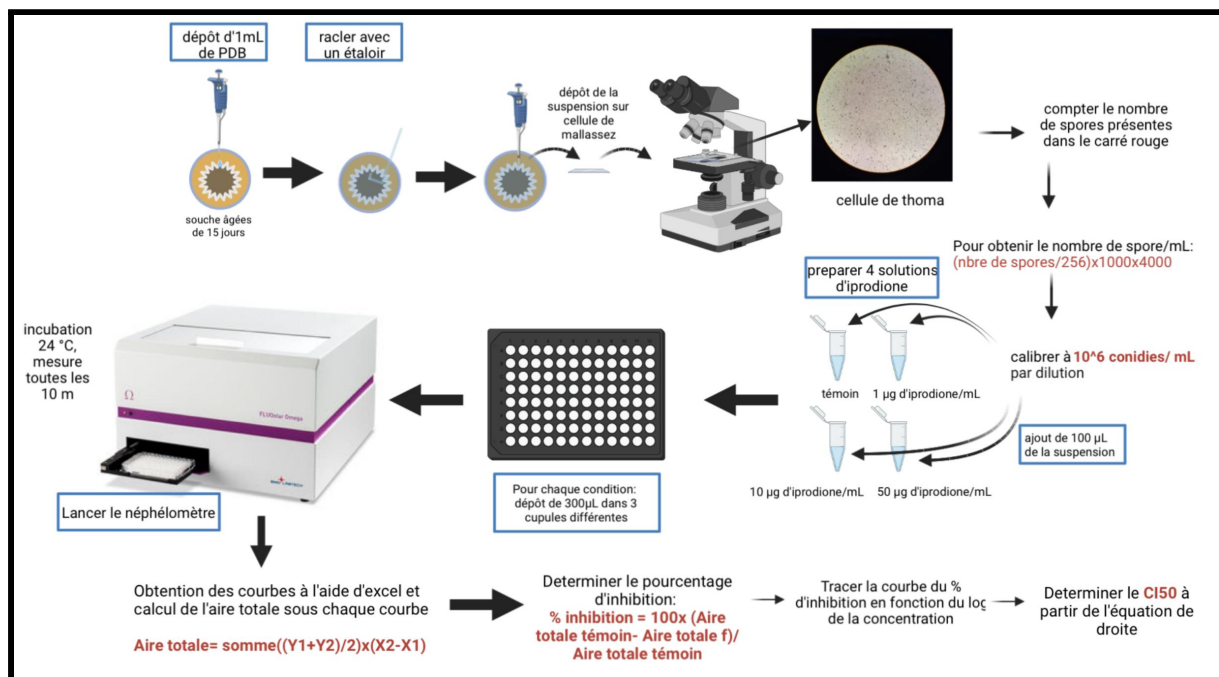


Figure 2: Protocole pour l'analyse du développement de souches fongiques (ABRA et 20M) dans un milieu liquide contenant différentes concentrations d'iprodione

Partie 2: Analyse du pouvoir pathogène

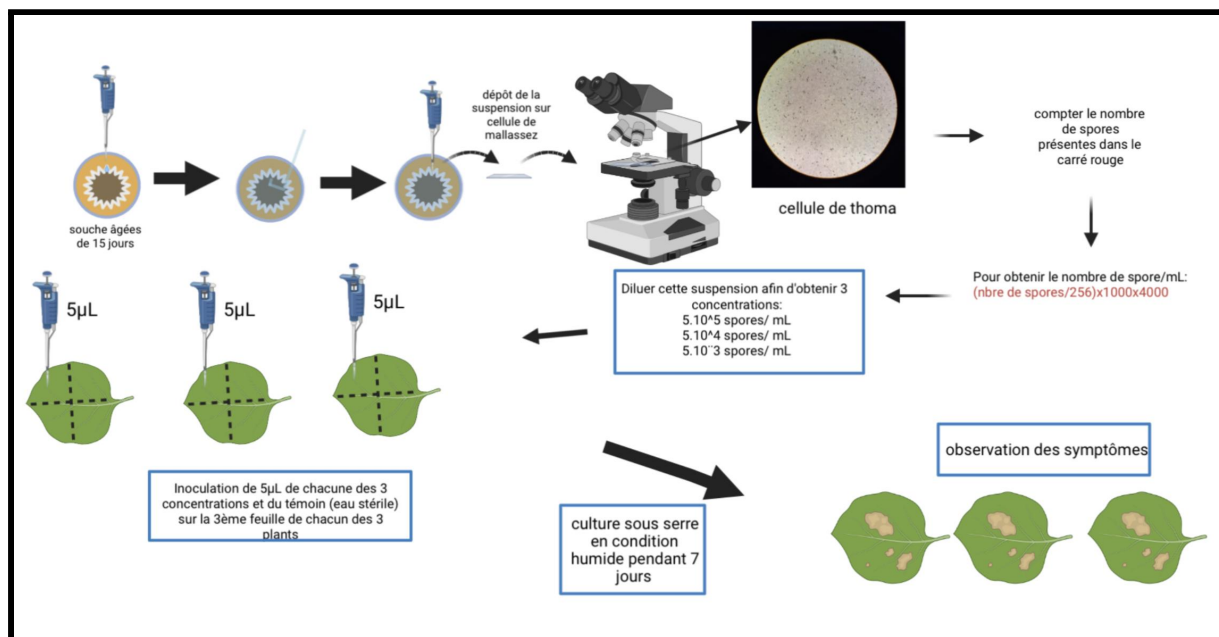


Figure 3: Protocole pour l'étude du pouvoir pathogène sur feuille de chou, des souches ABRA et 20M, à différentes concentrations en conidies inoculées

III- Résultats:

Notre binôme s'est focalisé sur l'étude de la souche ABRA. Ainsi, nous ne présentons ici que les résultats concernant cette souche.

Partie 1: sensibilité aux fongicides

A-Étude de la croissance radiale

Tout d'abord, nous avons commencé par étudier la croissance radiale de la souche ABRA sur boîtes de pétri contenant du milieu PDA et différentes concentrations du fongicide en iprodione. Nous avons observé des contaminations bactériennes au niveau de certaines de nos boîtes de pétri. (voir annexe: Figure A). Par conséquent, nous avons décidé d'exploiter les résultats d'un autre binôme qui étudiait la même souche.

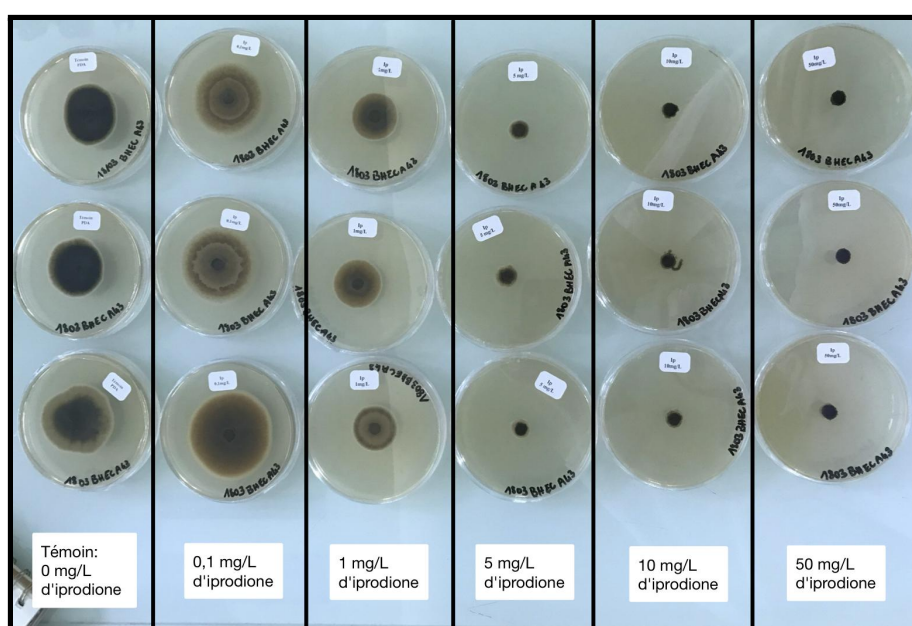


Figure 4: Culture de la souche ABRA sur boîtes de pétri contenant du milieu PDA et différentes concentrations d'iprodione

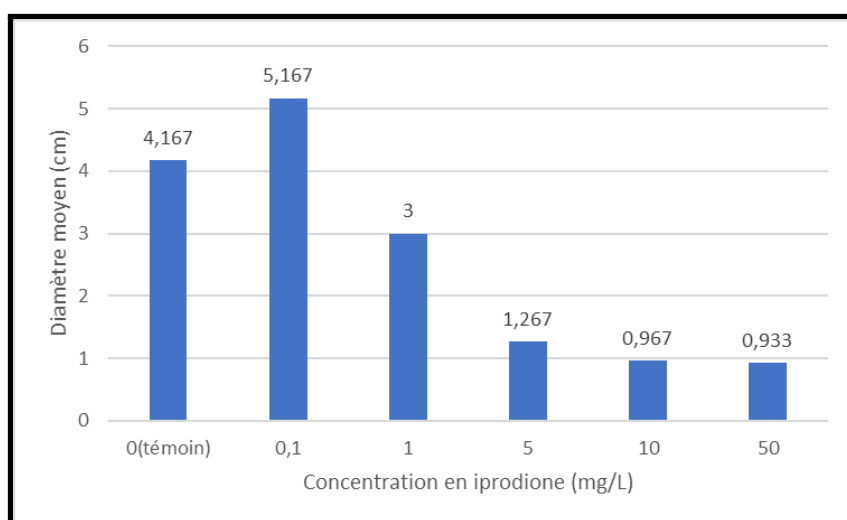


Figure 5: Diamètre moyen des colonies fongiques de souche ABRA sur boîtes de pétri contenant du milieu PDA et différentes concentrations en iprodione

Nous remarquons que les colonies fongiques témoins, c'est-à-dire celles qui n'ont pas été exposées au fongicide (iprodione) possèdent un diamètre moyen de 4,17 cm. Celles qui ont été exposées à une concentration de 0,1mg/L d'iprodione possèdent un diamètre moyen d'un cm plus élevé que les témoins. Enfin, les colonies exposées à 1; 5; 10; 50 mg/L d'iprodione possèdent respectivement un diamètre moyen de 3; 1,27; 0,97; et 0,93 cm. Ainsi, pour la souche ABRA, nous constatons que le diamètre des colonies fongiques diminue en fonction de la concentration en iprodione, sauf pour la concentration de 0.1 mg/L où l'on observe un plus grand diamètre et donc une plus grande croissance fongique. Ceci s'accompagne également d'une perte de densité mycélienne.

Ensuite, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique induite par chacun des 5 traitements de concentration variable en Iprodione (voir figure 1 pour la formule). Puis, nous avons tracé le graphique du pourcentage d'inhibition de la croissance de la souche ABRA en fonction du logarithme de la concentration en Iprodione (mg/L).

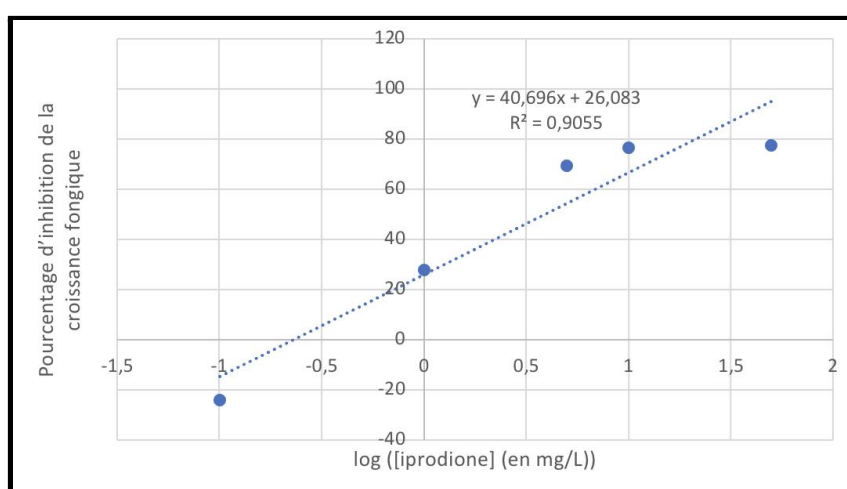


Figure 6: Pourcentage d'inhibition de la croissance de la souche ABRA en fonction du logarithme de la concentration en Iprodione (mg/L)*

* obtenue à partir de l'analyse de la croissance radiale en milieu solide

Nous observons que le coefficient de détermination (R^2) est de 0,9055. Celui-ci est par conséquent supérieur à 0,85, nous pouvons considérer que celui-ci est élevé. Ainsi, il y a une forte corrélation entre le pourcentage d'inhibition de la croissance de la souche ABRA et le logarithme de la concentration en Iprodione.

Grâce à ce graphique, nous avons obtenu la formule donnant la relation entre le pourcentage d'inhibition de la croissance et le logarithme de la concentration en Iprodione (mg/L):

$$\text{Log ([iprodione] (en mg/L))} = (\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique} - 26,083) / 40,696$$

Donc:

$$[\text{iprodione}] \text{ (en mg/L)} = 10^{((\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique} - 26,083) / 40,696)}$$

Ceci nous a permis de déterminer la concentration en fongicide nécessaire pour inhiber de 50% la croissance mycélienne (CI50). Ainsi, à l'aide de cette première méthode pourtant sur l'étude de la croissance radiale en boîte de pétri, nous avons déterminé que pour la souche ABRA, la CI50 est de **3.86 mg/L** d'iprodione.

B-Étude Néphélométrique

Ensuite, nous avons effectué une étude néphélométrique pour étudier la croissance fongique de la souche ABRA dans un milieu liquide. Par souci de cohérence et éviter une erreur d'interprétation causée par une possible contamination bactérienne, nous avons également décidé d'exploiter les résultats du binôme qui nous avait déjà transmis ses résultats pour l'étude en milieu solide.

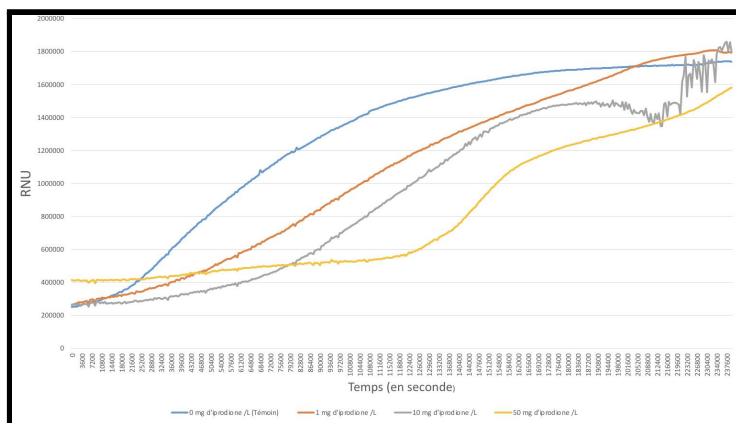


Figure 7: Mesure de la RNU en fonction du temps (en seconde) chez la souche ABRA exposé à 4 concentrations différentes en Iprodione.

Nous observons que pour chacune des 4 conditions de culture de la souche ABRA, il y a une augmentation de la RNU montrant une croissance fongique. Par ailleurs, plus la concentration en Iprodione est élevée, plus la phase de latence est longue. En effet, chez le témoin (0 mg/L d'iprodione), nous pouvons considérer que cette phase est quasiment inexistante alors que la souche ABRA exposé à une concentration de 50 mg/L, nous pouvons considérer que celle-ci se termine après environ 10 000 secondes.

Ensuite, nous avons déterminé l'aire totale sous chacune des 4 courbes. Par comparaison de l'aire totale sous la courbe de chacune des 3 conditions d'exposition à l'Iprodione avec l'aire totale chez le témoin, nous avons pu calculer le pourcentage d'inhibition de la croissance fongique induite par chacune des concentrations en Iprodione (voir figure 2 pour la formule). Puis, comme pour la première étude nous avons tracé le graphique du pourcentage d'inhibition de la croissance de la souche ABRA en fonction du logarithme de la concentration en Iprodione (mg/L).

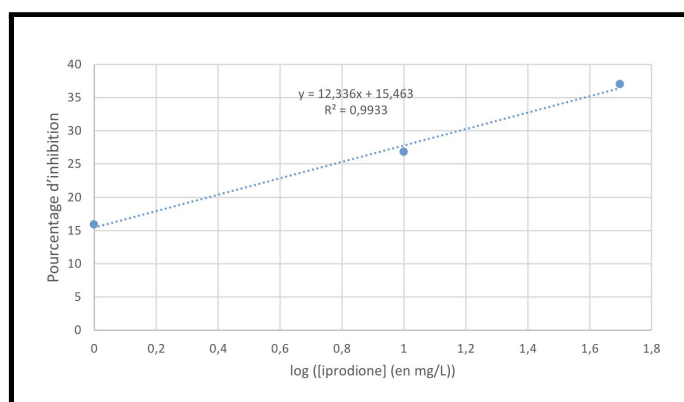


Figure 8: Pourcentage d'inhibition de la croissance de la souche ABRA en fonction du logarithme de la concentration en Iprodione (mg/L)*

*obtenue à partir de l'analyse néphélométrique

Nous observons que le coefficient de détermination (R^2) est de 0,9933. Celui-ci est par conséquent supérieur à 0,85, nous pouvons considérer que celui-ci est élevé. Ainsi, il y a une forte corrélation entre le pourcentage d'inhibition de la croissance de la souche ABRA et le logarithme de la concentration en Iprodione.

A partir de ce graphique, nous avons obtenu la formule donnant la relation entre le pourcentage d'inhibition de la croissance et le logarithme de la concentration en Iprodione (mg/L):

$$\text{Log ([iprodione] (en mg/L))} = (\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique} - 15,463) / 12,336$$

Donc:

$$[\text{iprodione}] \text{ (en mg/L)} = 10^{((\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance fongique} - 15,463) / 12,336)}$$

Comme pour la première étude, cette formule, nous avons pu déterminer la CI50. Ainsi, à l'aide de cette analyse par néphélométrie nous avons trouvé que pour la souche ABRA, la CI50 est de **630, 51 mg/L** d'iprodione.

Partie 2: Analyse du pouvoir pathogène

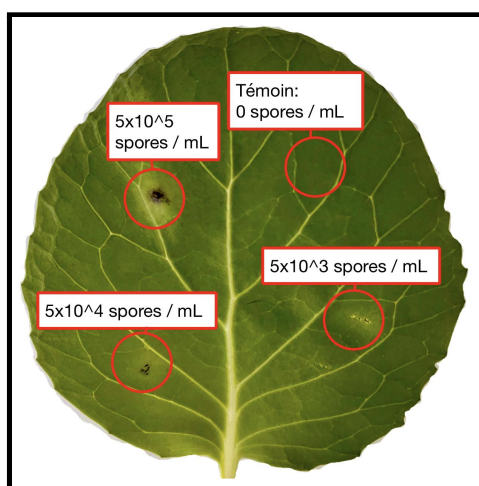


Figure 9: Aspect macroscopiques des symptômes sur feuille, 1 semaine après inoculation avec différentes concentrations en conidies de la souche ABRA.

Pour les différents réplicats exposés à la souche ABRA, nous observons sur les feuilles, la présence de taches noirs nécrotiques arrondies entourées d'un halo chlorotique au niveau de la zone sur laquelle les gouttes de conidies de concentration 5×10^3 ; 5×10^4 et 5×10^5 spores/mL ont été déposées. Nous n'observons pas ces symptômes chez le témoin. De plus, les symptômes sont plus prononcés (plus grand diamètre de chlorose et de nécrose) à une concentration de 5×10^5 spores/mL qu'à 5×10^4 spores/mL qui sont eux-mêmes plus marquées qu'à la concentration de 5×10^3 spores/mL. Ainsi, plus la concentration en inoculum augmente, plus de symptômes sont importants. Lors de la comparaison de nos différents réplicats, nous avons également observé que les symptômes étaient plus prononcés chez les plantes de petites tailles (données non présentées).

IV-Discussion:

Tout d'abord, nous avons constaté que pour la souche ABRA, le diamètre des colonies fongiques diminue en fonction de la concentration en iprodione (voir figure 4). Par ailleurs, grâce à cette étude, nous avons trouvé une CI50 assez faible pour la souche ABRA face à ce fongicide. En effet, nous avons constaté une réduction de 50 % de sa croissance par rapport au témoin lorsque celui-ci est exposé à une concentration de seulement 3.86 mg/L d'iprodione en boîte de pétri (voir figure 6). Ces résultats confirment donc la sensibilité de cette souche ABRA face à l'iprodione. D'autres groupes qui ont étudié la souche 20M d'*Alternaria brassicicola* ont eux observé que l'augmentation en iprodione ne provoquait pas de réduction de la croissance de cette souche. Mais pouvait au contraire provoquer une augmentation de son diamètre radial (voir annexe figure B). Contrairement à la souche ABRA, la souche 20M est considérée comme ayant une résistance à l'iprodione. Le fait que cette souche fabrique des filaments de mycélium plus long en présence du fongicide peut être considérée comme étant un mécanisme adaptatif pour limiter le stress induit.

Malgré la sensibilité de la souche ABRA pour ce fongicide, il ne faut pas oublier qu'après exposition à une concentration de 0.1 mg/L d'iprodione, nous observions tout de même une plus grande croissance radiale que chez le témoin (voir figures 4 et 5). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette très faible concentration en iprodione n'induit pas un stress suffisant pour inhiber la croissance de ce champignon mais qu'au contraire ce stress de faible intensité induit comme pour la souche 20M des réponses adaptatives qui se traduisent par l'augmentation de la croissance radiale afin de tenter de fuir les conditions stressante et par conséquent favoriser sa survie. Nous pouvons supposer que pour des concentrations plus fortes en fongicide, le stress induit devient trop important pour la souche ABRA et que par conséquent, les mécanismes adaptatifs pour échapper à celui-ci ne deviennent plus suffisants. Il est très probable que la souche 20M possède d'autres mécanismes supplémentaires lui permettant de lutter contre l'iprodione et lui conférer sa résistance.

Ensuite, si nous nous intéressons à comparer les résultats des deux premières analyses via le CI50, nous avons remarqué que la sensibilité d'ABRA face à l'iprodione varie selon les conditions de culture. En effet, cette sensibilité est bien plus faible dans le milieu liquide que dans le milieu solide (voir figures 6 et 8). Nous avons deux hypothèses pouvant possiblement expliquer cette observation. La première est que le milieu liquide, du fait de ses spécificités physiques, permettrait au champignon de plus facilement disposer des ressources nutritives présent dans le milieu par rapport au milieu solide et donc de plus facilement se développer malgré la présence de fongicide. La seconde hypothèse est que l'impact de l'iprodione sur le système d'osmorégulation serait moins important dans un milieu contenant beaucoup d'eau.

Par ailleurs, si nous comparons l'intérêt des 2 techniques que sont l'étude de la croissance radiale et l'étude néphélométrique. La première est nettement plus simple à réaliser mais l'étude en milieu liquide permet d'obtenir des résultats plus rapidement.

Enfin, dans la seconde partie nous avons vu que la souche ABRA d'*Alternaria brassicicola* pouvait causer des symptômes sur les feuilles de chou qui sont l'apparition de tâches nécrotiques entourées d'un halo chlorotique. D'ailleurs, nous avons observé que ces dégâts étaient proportionnels à la quantité de spore inoculée. Ceci peut s'expliquer par le fait que plus il y a de spores, plus il y a de chance que ceux-ci germent, et pénètrent rapidement dans la plante, puis se multiplient pour entraîner des dégâts visibles. Les mêmes types d'observations ont été réalisées pour la souche 20M.

V-Conclusion:

Nous avons vu que la souche ABRA d'*Alternaria brassicicola* est sensible à l'iprodione contrairement à la souche 20M qui elle est considérée comme étant résistante à ce fongicide. Nous avons également appris que ces deux souches peuvent effectivement provoquer des symptômes sur des feuilles de choux et que plus la concentration en spores d'*Alternaria brassicicola* inoculée chez les choux était élevée, plus il y avait de symptômes. Ainsi, l'utilisation raisonnée de l'iprodione pourrait être utile pour protéger les semences ou les plants en cours de végétation contre les alternarioses provoquées par la souche ABRA mais pas contre celles provoquer par la souche 20M.

VI- Annexe



Figure A: Culture fongique contaminé par des bactéries

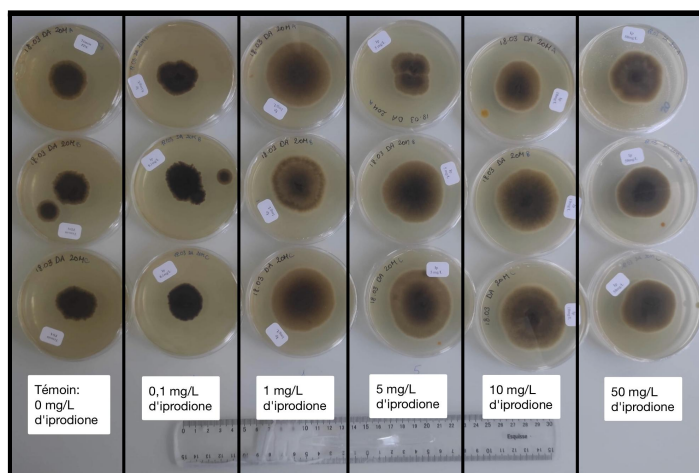


Figure B: Culture de la souche ABRA sur boîtes de pétri contenant du milieu PDA et différentes concentrations d'iprodione