

Table des matières

TABLE DES MATIERES.....	1
TABLE DES FIGURES.....	1
TABLE DES TABLEAUX	1
ETUDE DU POTENTIEL D'ISOLATS FONGIQUES ISSUS DU MICROBIOTE DE SEMENCES DE RADIS EN TANT QU'AGENT DE BIO-CONTROLE CONTREALTERNARIA BRASSICICOLA	1
1. Introduction	1
1.1. Structure d'accueil	1
1.2. Contexte scientifique	2
1.2.1. <i>Alternaria brassicicola</i> , agent du black spot des Brassicacées	2
1.2.2. Méthodes de lutte biologique	3
a) Mécanismes d'action des agents de bio-contrôle	3
b) Potentiel d'application de la lutte biologique en culture	4
1.2.3. Transmission verticale des champignons phytopathogènes	5
1.3. Problématique et objectifs.....	5
2. Matériel et Méthodes	5
2.1. Matériel biologique.....	5
2.2. Identification moléculaire d'isolats fongiques	6
2.2.1. Extraction d'ADN à partir d'isolats fongiques.....	6
2.2.2. Amplification de l'ADN pour l'indentification des isolats fongiques	6
2.2.3. Révélation des produits de PCR.....	7
2.2.4. Analyse des séquences	7
2.3. Tests de confrontation sur milieu solide	7
2.4. Test d'inhibition de la croissance d' <i>A. brassicicola</i> par des filtrats de cultures fongiques	8
2.5. Test de la capacité d' <i>A. alternata</i> à limiter la capacité de transmission d' <i>A. brassicicola</i> à la semence d' <i>A. thaliana</i>	8
3. Résultats	9
3.1. Identification moléculaire d'isolats fongiques	9
3.2. Interactions fongiques.....	10
3.2.1. Tests de confrontation sur milieu solide	10
3.2.2. Test d'inhibition de la croissance d' <i>A. brassicicola</i> par des filtrats de cultures fongiques	10
3.2.3. Test de la capacité d' <i>A. alternata</i> à limiter la capacité de transmission d' <i>A. brassicicola</i> à la semence d' <i>A. thaliana</i>	10
4. Discussion	11
4.1. Identification moléculaire des isolats fongiques	11
4.2. Interactions fongiques <i>in vitro</i>	12
4.3. Interactions fongiques <i>in planta</i>	14
5. Conclusions et perspectives	15
6. Bibliographie	17

Table des figures

Figure 1 : Organigramme de l'IRHS

Figure 2 : Cycle infectieux d'*Alternaria brassicicola* sur les Brassicacées

Figure 3 : Exemple de courbes de croissance d'*A. brassicicola* en présence des filtrats de culture des isolats antagonistes

Figure 4 : Représentation schématique de la nomenclature adoptée pour la numérotation des siliques lors du test de co-inoculation

Figure 5 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* sur milieu solide (PDA) en fonction de l'isolat antagoniste testé

Figure 6 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* en fonction du filtrat de culture fongique testé

Figure 7 : Effet de la co-inoculation sur la capacité de transmission d'*A. brassicicola* aux semences d'*A. thaliana*

Figure 8 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* sur milieu solide dilué (PDA) en fonction de l'isolat antagoniste testé (d'après Gastineau, 2017)

Figure 9 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* en fonction du filtrat de culture fongique testé (d'après Gastineau, 2017)

Table des tableaux

Tableau I : Isolats fongiques utilisés

Tableau II : Amorces utilisées et leur séquence

Tableau III : Identification des isolats fongiques C050, C051 et C004

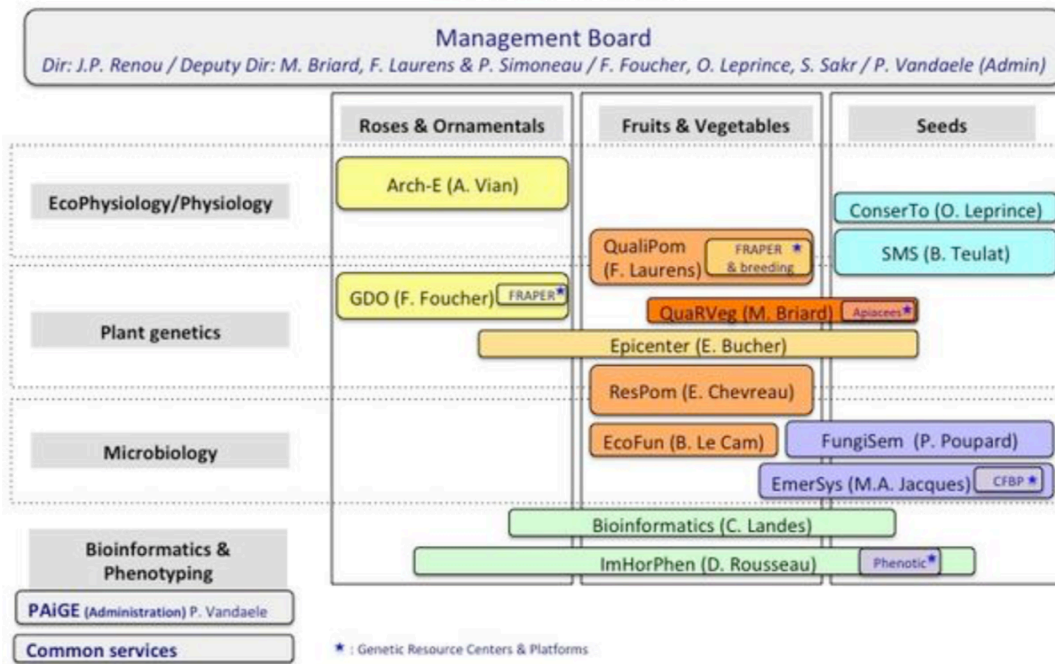


Figure 1 : organigramme de l'IRHS. Source : www.angers-nantes.inra.fr

Etude du potentiel d'isolats fongiques issus du microbiote de semences de radis en tant qu'agent de bio-contrôle contre *Alternaria brassicicola*

1. Introduction

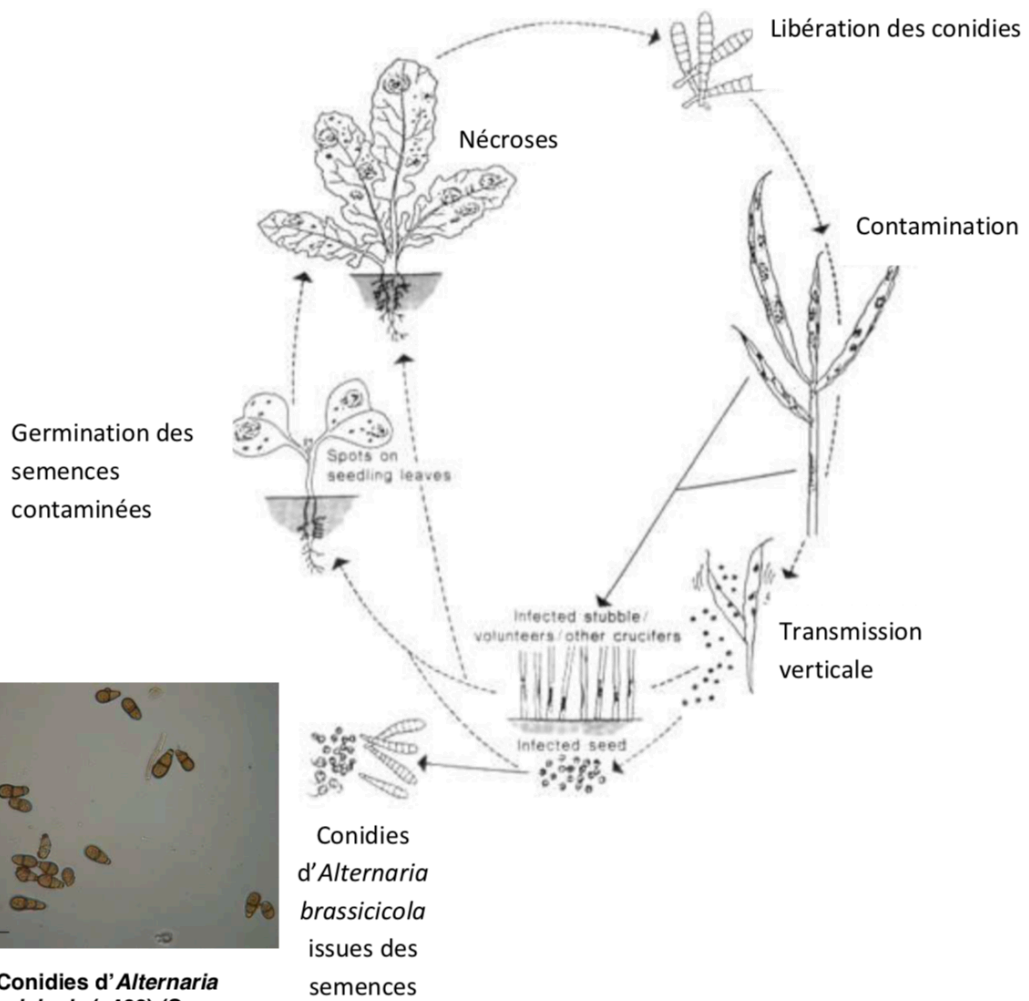
1.1. Structure d'accueil

L'institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) créé en 2012 par le regroupement de quatre unités (GenHort, PaVé, SAGAH et PMS), est une UMR (Unité Mixte de Recherche) sous la tutelle de l'INRA, l'Université d'Angers et Agrocampus Ouest. L'institut regroupe 13 équipes de recherche organisées en trois pôles : rosiers et plantes ornementales, fruits et légumes et semences (figure 1). L'IRHS regroupe ainsi environ 240 personnes dont 175 permanents, que ce soit des chercheurs, enseignants-chercheurs, des ingénieurs de recherche et d'étude ou des techniciens, ainsi que des personnes en contrat temporaire, des doctorants et post-doctorants ou encore des stagiaires.

Les recherches effectuées à l'IRHS utilisent des approches de physiologie/écophysiologie des plantes, de microbiologie, de génétique, ainsi que des approches transversales de phénotypage et de traitement des données -omiques grâce à la bio-informatique. L'IRHS mène également des recherches plus appliquées grâce à des projets développés en partenariat avec différents acteurs du secteur privé, notamment *via* la collaboration avec le pôle de compétitivité Végépolys (référence sitographique 1).

Les recherches menées à l'IRHS sont en partie financées par le RFI (Recherche, Formation et Innovation) Objectif Végétal, qui est un programme sur 5 ans développé sur l'initiative de la Région des Pays de la Loire pour alimenter la dynamique territoriale de recherche et d'innovation. Pour soutenir ce programme, la région Pays de la Loire et Angers Loire Métropole se sont engagés à allouer respectivement un budget de 4M et de 500 000 € sur 5 ans et l'Europe participe à hauteur de 800 000 à 1M€ via le Fonds Européens de Développement Régional (FEDER) (référence sitographique 2).

Enfin, l'IRHS est l'une des unités porteuses de la SFR (Structure Fédérative de Recherche) QUASAV (QUALité et SANté du Végétal) qui a pour objectif de coordonner et dynamiser la recherche dans le domaine du végétal sur le site d'Angers (référence sitographique 3).



Conidies d'*Alternaria brassicicola* (x400) (Source : personnelle)

Figure 2 : Cycle infectieux d'*Alternaria brassicicola* sur les Brassicacées. Source : Guillemette, 2003

L'équipe FungiSem étudie les mécanismes de transmission des champignons phytopathogènes à et par la semence, les déterminants du pouvoir pathogène ainsi que les interactions entre le pathogène, la semence et le microbiote associé, aboutissant à terme à l'élaboration de nouveaux moyens de lutte et de bio-contrôle.

Les travaux effectués par l'équipe sont principalement menés sur des champignons du genre *Alternaria* : *Alternaria dauci* et *Alternaria brassicicola*. Ils sont respectivement pathogènes des Apiacées (ex. *Daucus carota*) et des Brassicacées (comme *Arabidopsis thaliana* et *Raphanus sp.*) et possèdent la capacité de se transmettre à et *via* les graines (référence sitographique 4).

1.2. Contexte scientifique

La remise en cause de l'utilisation des pesticides s'est traduite par un renforcement au niveau européen de la législation des produits phytopharmaceutiques et par le retrait du marché de certains produits. A l'échelle nationale, le plan Ecophyto 2 vise à réduire l'usage des produits phytosanitaires de moitié d'ici 2025. L'objectif ici est de maintenir une agriculture de qualité avec un fort rendement, tout en s'inscrivant dans une dimension éco-responsable en favorisant l'utilisation de méthodes de lutte biologique (référence sitographique 5).

L'équipe FungiSem travaille depuis plusieurs années sur les mécanismes contrôlant la transmission des champignons pathogènes aux semences, et notamment sur le rôle que pourraient avoir les interactions entre *Alternaria brassicicola* et la microflore associée aux semences de Brassicacées sur cette étape-clé du cycle infectieux du champignon. Dans le cadre du projet MetaSEED (2013-2017), il a été montré qu'*A. brassicicola* influe sur la composition du microbiote des semences de radis : il diminue l'abondance de certaines espèces de champignons saprophytes, dont *Alternaria alternata*. A l'inverse, il a été montré que la co-inoculation de siliques avec *A. alternata* affectait la capacité de transmission aux semences d'*A. brassicicola* (résultats non publiés). L'objectif de ce travail est de poursuivre l'étude des interactions entre *A. brassicicola* et des isolats fongiques issus de semences de radis obtenus lors du projet MetaSEED, dans le but, à terme, d'identifier un ou des isolats utilisables pour développer une méthode de bio-contrôle.

1.2.1. *Alternaria brassicicola*, agent du black spot des Brassicacées

Alternaria brassicicola est un ascomycète nécrotrophe pathogène très dommageable pour les Brassicacées comme l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), la moutarde brune (*Brassica juncea*) ou le radis (*Raphanus sativus*). Il est en effet l'un des agents responsables de la maladie des taches noires (black spot) qui entraîne d'importantes pertes de rendements dans les cultures. *Alternaria brassicicola* a la capacité de se disséminer par contact avec les tissus atteints, mais il peut aussi infecter les graines *via* les siliques (figure 2) (Pochon *et al.*, 2012). Au niveau de la semence, les conidies peuvent se loger dans des creux et des aspérités

à la surface des téguments, et sont protégées des conditions environnementales peu favorables, mais le mycélium peut pénétrer dans les téguments, pouvant atteindre l'embryon dans de rares cas (Guillemette, 2003; Pochon *et al.*, 2012).

Actuellement, il existe peu de moyens de lutte efficaces contre ce pathogène. Seul l'emploi de mesures prophylactiques (destruction systématique des déchets végétaux, désinfection des outils) et l'utilisation de produits phytosanitaires permettent de réduire l'incidence de la maladie (Nowicki *et al.*, 2012). La désinfection et le traitement des semences par enrobage de fongicide constituent une méthode de lutte préventive (Mangain *et al.*, 2013).

L'utilisation de variétés résistantes au black spot constitue une piste de recherche dans la lutte contre le pathogène (Dharmendra *et al.*, 2014). Si des niveaux de résistance élevés ont été observés chez des Brassicacées non cultivées (*Capsella bursa-pastoris*) (Hansen & Earle, 1997 ; Guillemette, 2003), aucun caractère de forte résistance n'a encore été trouvé chez les Brassicacées cultivées (Nowicki *et al.*, 2012). Dans ce contexte, le développement de méthodes de lutte biologique semble être une piste à privilégier pour trouver des alternatives à la lutte chimique.

1.2.2. Méthodes de lutte biologique

Les méthodes dites de bio-contrôle, permettent de réduire l'impact sur l'environnement de la lutte contre les maladies des plantes, que ce soit en terme de diminution de la biodiversité ou de pollution. Le bio-contrôle peut se faire par l'application de stimulateurs de défenses des plantes (SPD) ou par l'utilisation d'agents de bio-contrôle (BCA : Biological Control Agent). Ces derniers peuvent être des insectes prédateurs de ravageurs ou des micro-organismes ayant un effet limitant sur la croissance des pathogènes. Les mécanismes de bio-contrôle sont classés par catégories : compétition, parasitisme ou prédation et antibiose (Di Pietro, 1994; Card *et al.*, 2015).

a) Mécanismes d'action des agents de bio-contrôle

Dans le cas de la lutte contre les champignons pathogènes par l'utilisation d'agents de bio-contrôle de nature fongique (BCF : BCA Fungi), les BCF contrôlent la maladie majoritairement par des mécanismes de myco-parasitisme, de production de composés antifongiques et de compétition pour les ressources et l'espace (Shoresh *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). De plus, l'utilisation de BCF pourrait avoir des effets bénéfiques sur l'état de santé général de la plante (Shoresh *et al.*, 2010).

Il est connu que de nombreux champignons produisent des composés ayant des propriétés pouvant interférer avec la croissance et l'activité d'autres champignons (Islam *et al.*, 2005; Leclere *et al.*, 2005). Par exemple, il a été montré que *Chaetomium globosum* produit des composés antifongiques (Vannacci & Harman, 1987), tout comme *Epicoccum nigrum* qui produit des épilactones et des épicocholides (Talontsi *et al.*, 2013). Ces

composés peuvent prendre la forme de composés diffusibles dans le milieu, ou bien exister sous la forme de VOCs (Volatile Organic Compounds). C'est le cas pour plusieurs champignons du genre *Fusarium* qui sont ainsi capables d'inhiber la croissance de plusieurs pathogènes chez le coton (Zhang *et al.*, 2014).

Dans la perspective d'élaborer de nouvelles méthodes de bio-contrôle, l'utilisation d'espèces saprophytes se développant plus rapidement que les espèces pathogènes est prometteuse. Par sa croissance rapide, le BCF limiterait celle de l'agent pathogène, l'empêchant ainsi d'atteindre le stade de développement nécessaire pour l'expression du pouvoir pathogène. Il a été montré que des souches d'*Alternaria alternata* et *Cladosporium cladosporioides* sont capable de limiter la croissance de champignons tels que *Sclerotinia sclerotinium* sur le pois, non pas par antibiose, mais par compétition pour les nutriments (Boland & Hunter, 1988).

De nombreux cas de contrôle des maladies fongiques par parasitisme des agents pathogènes par d'autres souches fongiques sont connus. C'est par exemple le cas des souches appartenant aux genres *Trichoderma* ou *Peincillium*, qui ont la capacité de parasiter *Alternaria brassicicola* (Vannacci & Harman, 1987). Dans ce cas, les hyphes de l'espèce parasite pénètrent les hyphes de l'hôte, permettant ainsi la ponction des nutriments (Hoch, 1977; Alabouvette *et al.*, 2009).

b) Potentiel d'application de la lutte biologique en culture

L'amélioration et la protection des cultures passe traditionnellement par la sélection d'espèces végétales plus performantes et par la création d'intrants et de produits phytosanitaires. Mais il apparaît que l'impact du microbiote associé aux plantes sur leur croissance et leur santé n'est pas négligeable. L'utilisation de la flore microbienne, particulièrement la flore fongique, en tant que BCA pourrait permettre de réduire drastiquement l'utilisation de produits phytosanitaires (Shoresh *et al.*, 2010).

De plus, certains BCA peuvent être transmis à la génération suivante *via* la semence. Cet aspect pourrait permettre d'éviter une inoculation répétée qui se révèle coûteuse (Card *et al.*, 2015). Les BCA peuvent aussi être utilisés en enrobage pour les semences.

Cependant, la commercialisation des BCF se heurte à des obstacles d'ordre technique et économique. En effet, le coût de production des agents de bio-contrôle est plus élevé que celui des fongicides issus de l'industrie chimique. Leur conditionnement est également plus compliqué et onéreux : les BCF doivent être conditionnés sous forme de conidies pour optimiser la survie du champignon et pour limiter les coûts de transport (Fravel, 2005).

Malgré tout, la littérature s'accorde sur le fait que les champignons ont un fort potentiel en tant que BCA (Di Pietro, 1994; Card *et al.*, 2015; Barret *et al.*, 2016).

Tableau 1 : Isolats fongiques utilisés

Nom de l'isolat	Genre/ Espèce	Référence et origine
Abra43	<i>Alternaria brassicicola</i>	(Iacomi-Vasilescu, 2001)
NB42	<i>Alternaria alternata</i>	(Bessadat <i>et al.</i> , 2017)
C004	<i>Alternaria alternata</i>	Essai MetaSEED 2015
C050	<i>Alternaria alternata</i>	Essai MetaSEED 2015
C051	<i>Alternaria alternata</i>	Essai MetaSEED 2015
AI035	<i>Epicoccum sp.</i>	Essai MetaSEED 2015
ABAI015	<i>Epicoccum sp.</i>	Essai MetaSEED 2015
ABAI028	<i>Cladosporium sp.</i>	Essai MetaSEED 2015
ABAI065	<i>Fusarium graminearum</i>	Essai MetaSEED 2015

1.2.3. Transmission verticale des champignons phytopathogènes

Pour la majorité des espèces fongiques pathogènes des plantes, la dispersion se fait de manière strictement horizontale, que ce soit par contact direct par dispersion anémophile ou par splashing. Mais dans certains cas, la transmission est également verticale : du parent à la descendance *via* la semence (Fine, 1975). Cette dernière présente un impact important sur l'occurrence de la maladie dans le sens où la transmission est beaucoup moins impactée par les conditions environnementales (conditions météorologiques, passages d'animaux, ...) que la transmission horizontale (Oliver *et al.*, 2001). La transmission à la semence se fait selon trois modalités, par les fleurs, de manière systémique ou alors par voie externe (par contact du fruit avec l'agent pathogène) (Rezki *et al.*, 2016).

Si, au cours de cette transmission verticale, le passage des téguments de la graine ne semble pas être une barrière pour le pathogène en revanche, le champignon ne passe pas toujours de la semence à la plantule (Afkhami & Rudgers, 2008). La transmission verticale est donc un processus de transmission imparfait, et l'étape limitante résiderait dans la germination (Hodgson *et al.*, 2014).

1.3. Problématique et objectifs

L'objectif de ce stage est de déterminer si certains isolats fongiques issues du microbiote de semences de radis sont capables de limiter le développement d'*Alternaria brassicicola*. Dans un premier temps, l'identification de 2 isolats récemment obtenus a été réalisée par voie moléculaire. Ensuite, des confrontations sur milieux solides entre les différents isolats et *A. brassicicola* ont été effectuées et l'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* ont été observés. Afin de déterminer si la capacité d'inhibition est liée à la production et la diffusion de composés solubles, l'action des filtrats de cultures des isolats fongiques sur la capacité de croissance d'*A. brassicicola* en milieu liquide a été déterminée. Enfin, la capacité de deux isolats d'*A. alternata* à limiter la transmission d'*A. brassicicola* à la semence a été testée par co-inoculation de siliques d'*Arabidopsis thaliana* et l'analyse microbiologique des graines.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel biologique

La souche Abra43 d'*Alternaria brassicicola* utilisée au cours des manipulations provient d'un isolement effectué à partir de graines de radis (Iacomi-Vasilescu, 2001) (tableau 1). Pour tester les interactions avec

Abra43, des isolats fongiques d'*Epicoccum sp.* (ABAI015 et AI035), de *Cladosporium sp.* (ABAI028), de *Fusarium sp.* (ABAI065) et d'*Alternaria alternata* (C004 et NB42) ont été utilisés. Ces isolats ont tous été obtenus à partir de semences de radis issues d'un essai mené en 2015 à la FNAMS (Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicazteurs de Semences, Brain-sur-l'Authion) lors du projet MetaSEED, à l'exception de l'isolat NB42 d'*Alternaria alternata*, isolé à Alger à partir de graines de chou (Bessadat *et al.*, 2017) et qui constitue un isolat de référence pour l'espèce *A. alternata* dans le laboratoire. Deux autres isolats obtenus récemment à partir du même lot de semences de radis récoltés dans le cadre du projet MetaSEED, et dont l'identité était inconnue au démarrage de ce travail, ont été également étudiés : C050 et C051. Tous ces isolats ont été conservés dans du glycérol à -80°C et cultivés en routine sur milieu PDA (Potato Dextrose Extract 24g/L, agar 15g/L) à 22°C.

Le matériel végétal utilisé pour les expérimentations de transmission à la semence était constitué de plantes d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Ler, Landsberg *erecta*). Les plantes ont été cultivées en jours longs (16h jour/8h nuit) pendant 35 jours (Pochon, 2012).

2.2. Identification moléculaire d'isolats fongiques

Lors de ce stage, une identification moléculaire de différents isolats (C050, C051 et C004) a été réalisée. Pour cela il a été nécessaire d'extraire de l'ADN, réaliser des amplifications avec trois couples d'amorces et analyser les séquences obtenues

2.2.1. Extraction d'ADN à partir d'isolats fongiques

Une extraction d'ADN par la méthode de Goodwin et Lee (1993) a été effectuée. Un échantillon de mycélium d'une culture sur boîte de Petri âgée de 7 jours, a été prélevé et placé dans un microtube de 1,7mL, puis 100 µL de tampon de lyse (Tris-HCl pH 7,2 50mM, 50mM EDTA, 3% SDS (p/v), 1% 2-mercaptoéthanol (v/v)) ont été ajoutés. Les échantillons ont été placés dans un four à micro-ondes (850W maximum) avec le bouchon ouvert pendant 15, 10 puis 5s. Trois cents microlitres de tampon de lyse chaud (80°C) ont été ajoutés, puis les tubes ont été mis à incuber à 80°C pendant 10 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 15000g. La phase aqueuse a alors été récupérée dans un nouveau microtube. Pour précipiter l'ADN, 10 µL d'acétate de potassium (5M) ainsi que 180 µL d'isopropanol ont été ajoutés dans les tubes qui ont ensuite été placés 5 minutes dans la glace, avant d'être centrifugés 10 minutes à 10000g. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé à l'éthanol 80%. Enfin, le culot a été séché sous vide, puis repris dans 100 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 0,1mM) et conservé à -20°C.

2.2.2. Amplification de l'ADN pour l'identification des isolats fongiques

Une amplification en chaîne par polymérase (PCR) a été réalisée à partir des extraits d'ADN dans des volumes de 50µL contenant du tampon de réaction Tris-HCl pH 9,0 50mM (GoTaq Flexi Buffer, Promega,

Tableau 2 : Amorces utilisées et leur séquence

Amorce	Séquence	Source
ITS1	3'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G- 5'	(White <i>et al.</i> , 1990)
ITS4	3'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC- 5'	
TEF1-INTF	3'-CCG-TGA-YTT-CAT-CAA-GAA-CAT-G- 5'	(Jaklitsch & Voglmayr, 2015)
TEF1-INTR	3'-TTG-GCA-GTG-TCC-ATC-TTG- 5'	
gpd1	3' -CAA-CGG-CTT-CGG-TCG-CAT-TG- 5'	(Berbee <i>et al.</i> , 1999)
gpd2	3' -GCC-AAG-CAG-TTG-GTT-CTG- 5'	

Madison, Wisconsin), du NaCl 50mM, du MgCl₂ 5mM, chacun des 4 dNTP 200 μM, chacune des 2 amorces 400nM, 1 unité de Taq polymérase (GoTaq G2 Hot Start Polymérase, Promega) et 2μL d'extrait d'ADN fongique ou d'eau milliQ (pour le témoin négatif). Les amorces ITS 1 et ITS 4 ciblant l'Internal Transcribed Spacer ont été utilisées (White *et al.*, 1990), ainsi que les amorces TEF1-INTF et TEF1-INTR (Jaklitsch & Voglmayr, 2015) ciblant le gène codant le facteur d'élongation 1 α , et les amorces gpd1 et gpd2 (Berbee *et al.*, 1999) ciblant la séquence codant la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (tableau 2). Les PCR ont ensuite été réalisées dans un thermocycleur avec le programme suivant : 5 minutes à 94°C, puis 35 cycles tels que 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 52°C pour les amorces ITS1-ITS4 (48°C pour les amorces TEF1-INTF et TEF1-INTR, 55°C pour les amorces gpd1-gpd2), 1 minute 72°C puis une élongation finale de 10 minutes à 72°C a été effectuée. Les produits des PCR ont été conservés à 4°C avant d'être déposés sur gel d'agarose.

2.2.3. Révélation des produits de PCR

Dix microlitres de produits PCR et 5 μL du marqueur de taille (Smart-Ladder Small Fragment, Promega) ont été déposés sur un gel d'agarose à 1,2% (p/v) et soumis à une électrophorèse à 100V pendant 20 minutes. Après la migration, le gel d'agarose a été plongé dans une solution de bromure d'éthidium (BET) et observé sous rayons ultraviolets. Les produits PCR ont été séquencés chez Eurofins Genomics (Paris).

2.2.4. Analyse des séquences

Les séquences ont été comparées avec les séquences présentes dans la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant l'interface de "standard nucleotide BLAST" (référence sitographique 6).

2.3. Tests de confrontation sur milieu solide

Les tests de confrontation entre les différents isolats fongiques et *Alternaria brassicicola* (Abra43) ont été effectués sur milieu PDA en déposant deux explants (un d'Abra43 et un d'un autre isolat), issus d'une culture âgée de 7 jours, sur milieu PDA dans 2 coins opposés de boîtes de Petri carrées (120mm x 120mm). Les boîtes ont été placées à 22°C pendant 15 jours. Le rayon de croissance d'Abra43 a été mesuré au bout de 15 jours environ le long de la diagonale de la boîte et comparé au rayon de croissance de boîtes témoin ne contenant qu'un explant d'Abra43 dans un coin. Chaque test a été effectué en triplicata. Un rayon moyen a été calculé pour les boîtes témoin et pour les boîtes de confrontation, puis un pourcentage d'inhibition de la croissance a été déterminé selon la formule :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de croissance} = \frac{(\text{rayon témoin} - \text{rayon confrontation}) * 100}{\text{rayon témoin}}$$

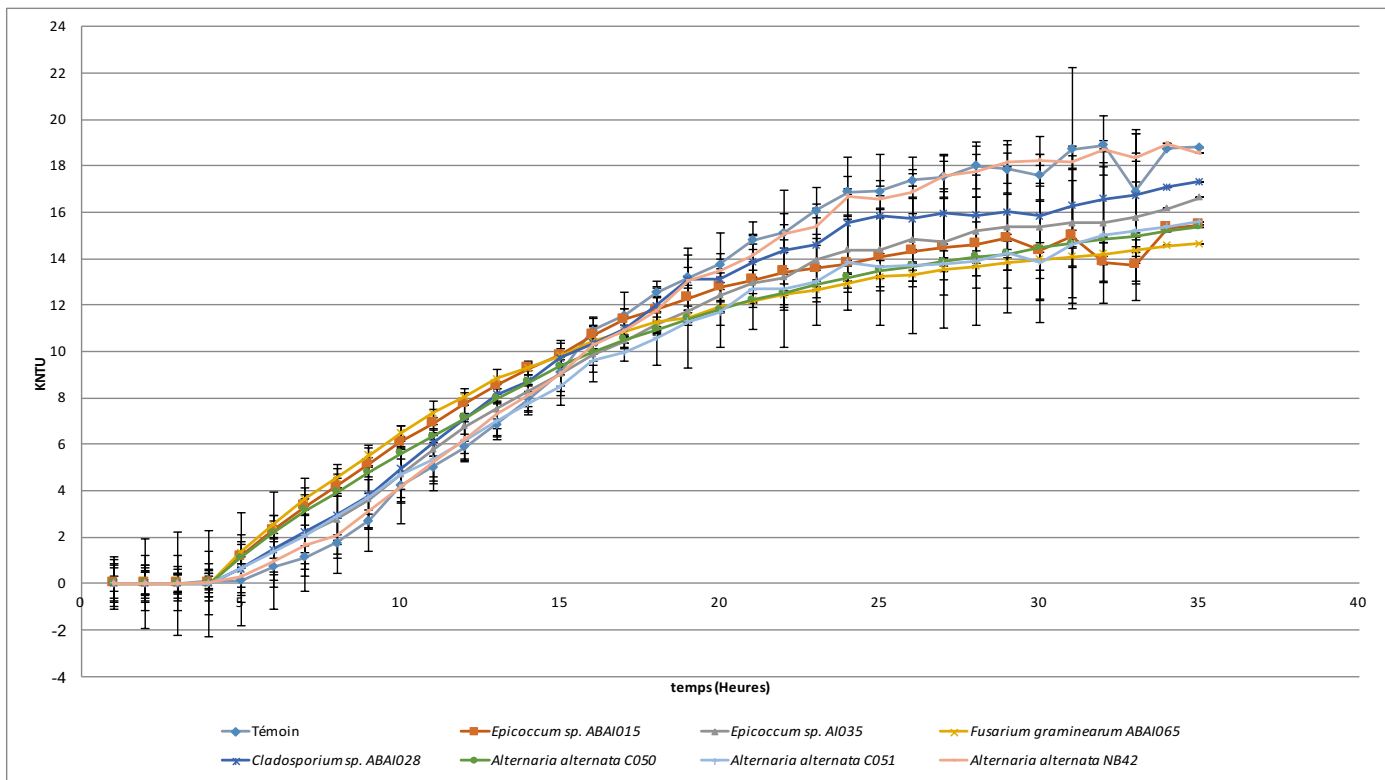


Figure 3 : Exemple de courbes de croissance d'*A. brassicicola* en présence des filtrats de culture des isolats antagonistes. Les moyennes sont calculées à partir des trois réplicats techniques

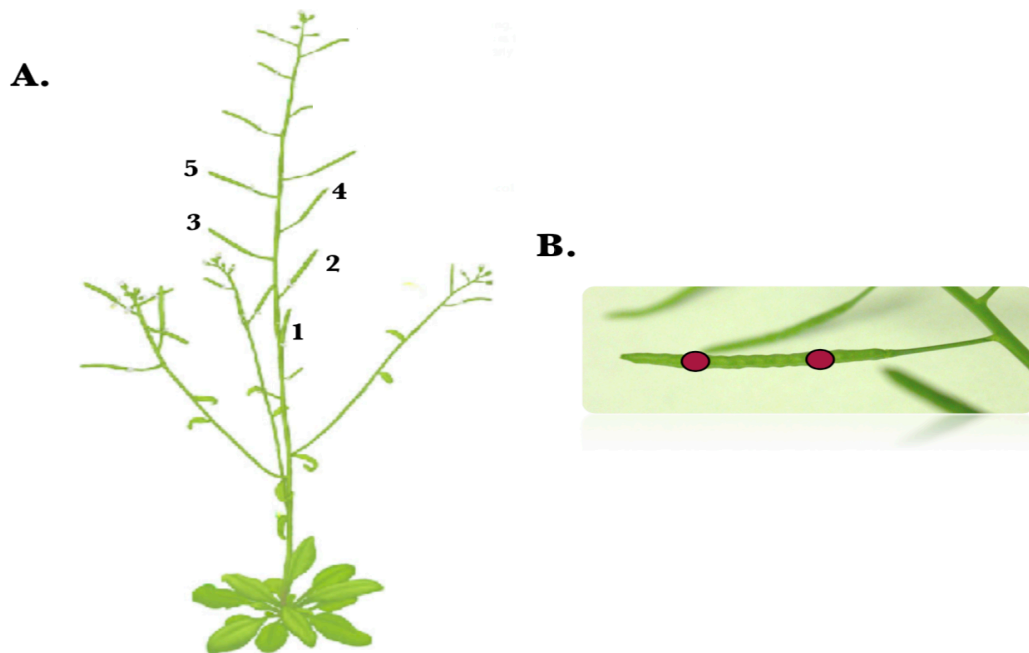


Figure 4 : **A** : Représentation schématique de la nomenclature adoptée pour la numérotation des siliques lors de l'inoculation par dépôt de gouttes d'une suspension de conidies d'*A. brassicicola* et *A. alternata* sur les siliques d'*A. thaliana*. **B** : Localisation des deux gouttes d'inoculum conidies sur une silique d'*A. thaliana*. Source : Pochon, 2012

2.4. Test d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* par des filtrats de cultures fongiques

Des filtrats de culture ont été préparés en cultivant chacun des isolats pendant 7 jours à 22°C, sous agitation (150 rpm) et à l'obscurité, à partir d'un explant d'une culture âgée de 7 jours sur milieu PDA, placé dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu Potato Dextrose Broth (PDB) (24g/L). Un témoin négatif (Erlenmeyer contenant 100 mL de milieu PDB mais aucun explant) a été réalisé. Les milieux de culture ont ensuite été recueillis et filtrés sur membranes stériles de 0,2 µm, puis stockés à 4°C.

Une suspension de conidies d'Abra43 concentrée à 10⁶ conidies/mL a été préparée à partir d'une culture âgée de 7 jours sur milieu PDA, dans de l'eau stérile par dénombrement à la cellule de Thoma. Un volume de 10 µL de filtrat de culture de chaque isolat fongique puis 100µL de la suspension d'Abra43 ont été ajoutés à 890µL de milieu PDB dans un microtube. Différents tubes témoins ont été préparés : 1) 990µL de milieu PDB et 10µL de chacun des filtrats de culture des isolats fongiques, 2) 990µL de milieu PDB et 10µL de filtrat témoin, 3) 1mL de PDB pur, 4) 900µL de PDB et 100µL de suspension d'Abra43 et 5) 890µL PDB, 10µL de filtrat témoin et 100µL de suspension d'Abra43.

Le contenu de chaque tube a été réparti dans 3 puits (300µL par puits, répétitions techniques) sur une plaque de 96 puits. Cette plaque a ensuite été placée à 22°C dans un néphélomètre (NEPHELOstar Galaxy, BMG Labtech, Offenburg, Allemagne) avec un laser réglé à une longueur d'onde de 635 nm. Le néphélomètre permet d'évaluer le développement des champignons par mesure de la turbidité de la solution (Joubert *et al.*, 2010). La plaque 96 puits a été agitée (170 tours/min) pendant cinq minutes avant chaque mesure. Une mesure a été effectuée toutes les dix minutes pendant trente-trois heures et dix minutes (deux cents cycles). Les courbes de croissance d'Abra43 (figure 3) ont été récupérées. Le pourcentage d'inhibition de la croissance d'Abra43 par les filtrats de cultures fongiques a été calculé à l'aide d'une matrice Excel permettant de calculer la moyenne des aires sous la courbe à partir des trois répétitions techniques.

2.5. Test de la capacité d'*A. alternata* à limiter la capacité de transmission d'*A. brassicicola* à la semence d'*A. thaliana*

Afin de déterminer si les isolats d'*Alternaria alternata* NB42 et C004 ont une incidence sur la capacité d'Abra43 à se transmettre aux semences, des co-inoculations de siliques ont été effectuées et le taux de contamination des graines récoltées a été comparé au taux de contamination des graines obtenues à partir de siliques inoculées avec Abra43 seul. La souche d'Abra43 utilisée pour cette expérimentation est un transformant d'Abra43, Abra43mcherrylns1.14. Ce transformant a été construit pour exprimer la protéine fluorescente mcherry dans le noyau, mais il a été utilisé ici uniquement pour sa résistance aux fongicides. En effet, Abra43mcherrylns1.14 a été obtenu par l'intégration d'une cassette dans le gène codant l'histidine

Tableau 3 : Identification des isolats fongiques C050, C051 et C004. ITS, GPD et EF1 α représente les marqueurs génétiques utilisés : ITS (Internal Transcribed Spacer) ; GPD (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) ; EF1 α (Elongation Factor 1- α).

Nom de l'isolat	Pourcentages d'identité avec un genre ou une espèce (No Acc. Genank)		
	ITS	GPD	EF1 α
C004	100% <i>Alternaria alternata</i> (MF422133.1)*	N.D.	100% <i>Alternaria alternata</i> (KU886569.1)
C050	100% <i>Alternaria alternata</i> (MF497381.1)	100% <i>Alternaria alternata</i> (MF279640.1)	100% <i>Alternaria alternata</i> (KU886569.1)
C051	100% <i>Alternaria alternata</i> (MF497381.1)	100% <i>Alternaria alternata</i> (MF279640.1)	100% <i>Alternaria alternata</i> (KU886569.1)

* : Isolot dont l'identification ITS avait été effectuée antérieurement

** : Isolot pour lequel le résultat de séquençage n'a pas pu être exploité

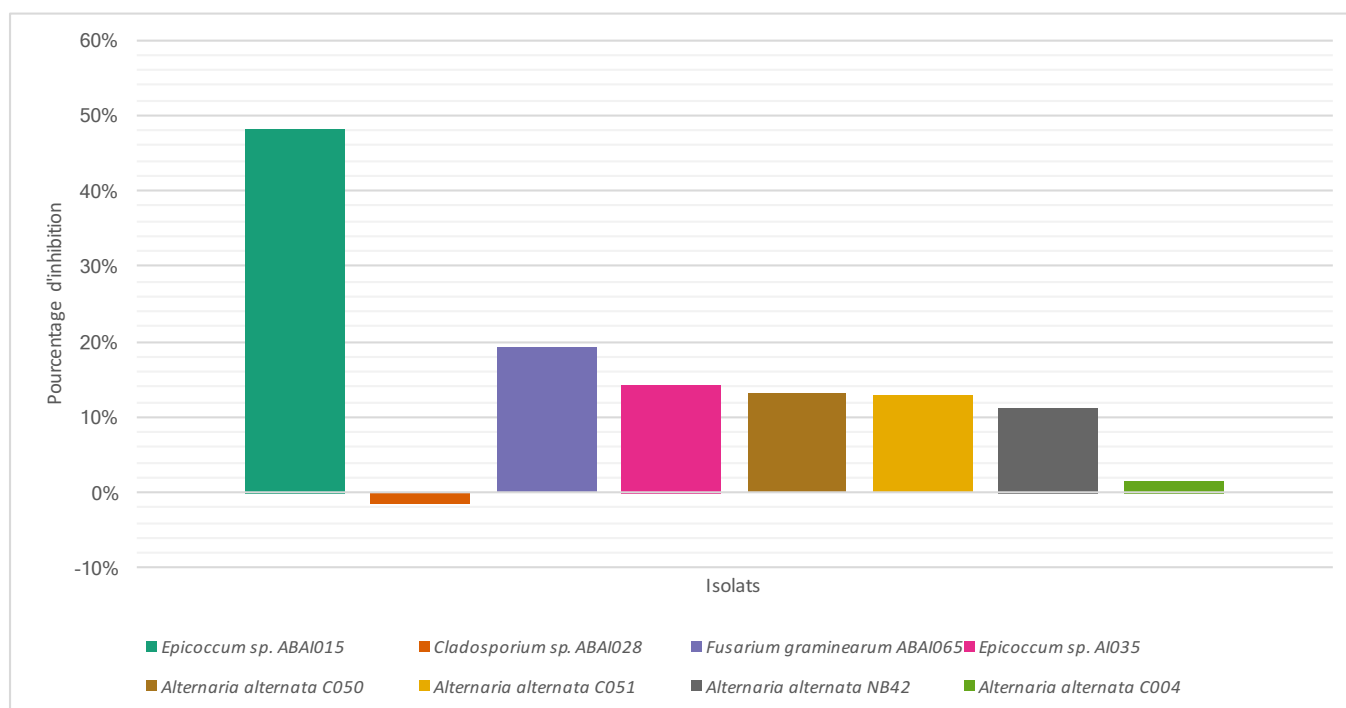


Figure 5 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'A. brassicicola sur milieu solide (PDA) en fonction de l'isolat antagoniste testé

kinase AbNIK1, cible potentielle d'une famille de fongicides, les phénylpyrroles (Avenot *et al.*, 2005). Le taux de graines contaminées par Abra43mcherrylns1.14 a donc été déterminé en incubant les graines récoltées sur milieu PDA contenant du fludioxonil (famille des phénylpyrroles), milieu qui inhibe le développement des deux isolats d'*A. alternata*.

Trois suspensions de conidies ont été préparées par dénombrement à l'aide d'une cellule de Thoma dans une solution de Tween à 0,1% : une suspension de conidies d'Abra43mcherrylns1.14 à 10^3 conidies/mL, une suspension de conidies d'Abra43mcherrylns1.14 et C004 à 10^3 conidies/mL par isolat et une suspension de conidies d'Abra43mcherrylns1.14 et NB42 à 10^3 conidies/mL par isolat.

Pour l'inoculation, selon le protocole décrit par Pochon *et al.* (2012), 2 gouttes de 2,5µL de suspension ont été déposées sur les 5 siliques les plus âgées sur l'axe principal de plantes d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 35 jours (figure 4). Trois plantes ont été inoculées avec suspension d'Abra43mcherrylns1.14, 3 avec la suspension C004/Abra43mcherrylns1.14 et 3 avec la solution NB42/Abra43mcherrylns1.14. Trois plantes ayant reçu deux gouttes de 2,5µL de solution de Tween 0,1% (v/v) sur les 5 siliques les plus âgées sur l'axe principal ont servi de témoin négatif. Les plantes ont été placées en enceinte climatique (16h lumière 22°C/ 8h obscurité 19°C). Elles ont, dans un premier temps, été soumises à l'obscurité et à une humidité saturante pendant 48h. Les siliques ont été prélevées dix jours après l'inoculation, et les graines ont été récoltées individuellement et placées sur milieu PDA contenant du fludioxonil à 50 µg/mL. Le nombre de graines contaminées par Abra43mcherrylns1.14 a été déterminé 3 jours plus tard (Pochon, 2012). Des probabilités d'infection des graines d'*A. thaliana* par Abra43mcherrylns1.14 ont été calculées et des analyses statistiques sur les probabilités d'infection ont été réalisées grâce au logiciel R (version 3.5.0) en utilisant un modèle linéaire généralisé (glm) suivant un modèle binomial (régression logistique). Pour chaque modèle, un intervalle de confiance de 97,5% a été calculé.

L'effet de la présence de NB42 ou de C004 sur la capacité de transmission d'Abra43 a été évalué en comparant la probabilité de contamination de graines d'*A. thaliana* après inoculation de siliques par Abra43mcherrylns1.14 seul, avec la probabilité de contamination des graines après co-inoculation avec NB42 ou C004.

3. Résultats

3.1. Identification moléculaire d'isolats fongiques

L'identification moléculaire a concerné 3 isolats : C004, C050 et C051. L'isolat C004 a été identifié, antérieurement à ce stage, comme appartenant à l'espèce *Alternaria alternata*, sur la base du séquençage de la région ITS (tableau 3). L'identification sur la base du séquençage étant considérée comme imprécise ou peu fiable (Prakash *et al.*, 2017; Bessadat *et al.*, 2017), l'analyse de séquences à 2 autres loci, le facteur d'élongation 1 α (EF1 α) et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), permettant de discriminer

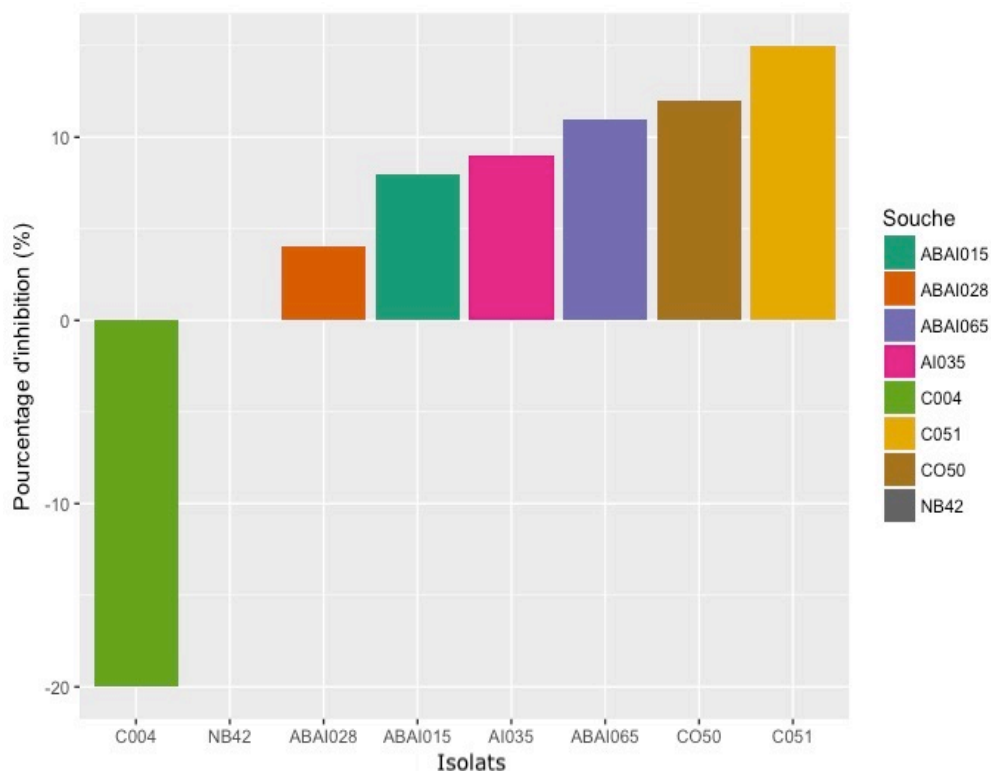


Figure 6 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* en fonction du filtrat de culture fongique testé. ABAI015 : *Epicoccum* sp. ; ABAI028 : *Cladosporium* sp. ; ABAI065 : *F. graminearum* ; AI035 : *Epicoccum* sp. ; C050 : *A. alternata* ; C051 :

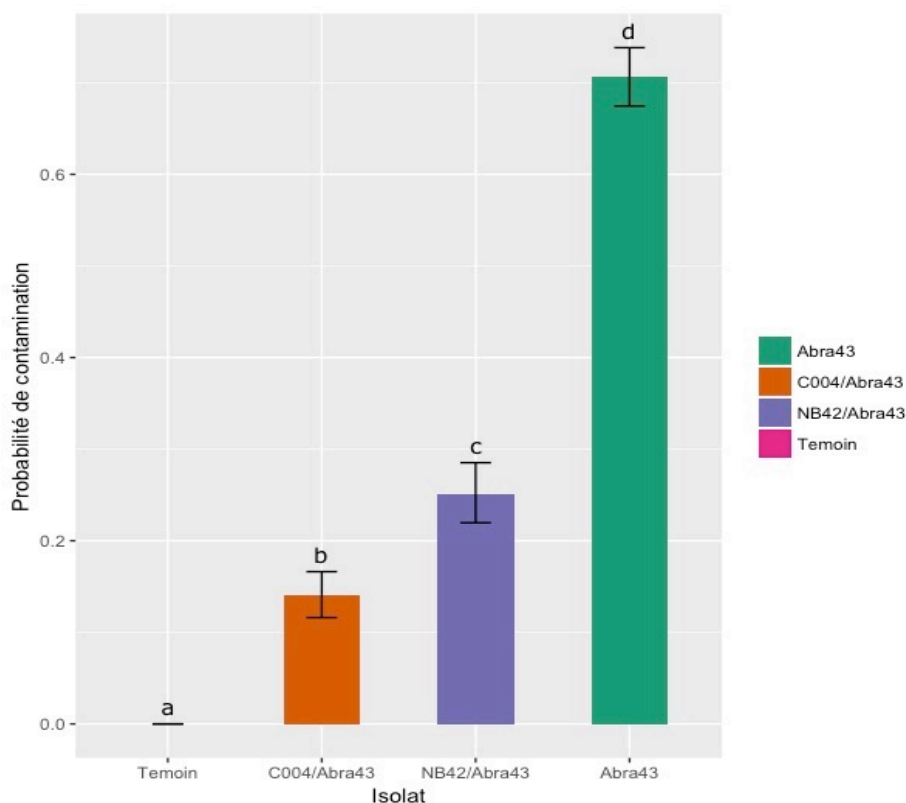


Figure 7 : Effet de la co-inoculation avec *A. alternata* sur la capacité de transmission d'*A. brassicicola* aux semences d'*A. thaliana*. Abra43 : *A. brassicicola* ; C004 : *A. alternata* ; NB42 : *A. alternata*. Modèle linéaire généralisé (glm) suivant un modèle binomial (régression logistique) au seuil de significativité $\alpha = 0,05$. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 97,5%. Les lettres a, b, c et d représentent une différence significative entre les conditions avec $p < 0,001$.

les espèces d'*Alternaria* (Bessadat *et al.*, 2017) a été entreprise. La séquence GPD obtenue n'a pas pu être exploitée, en revanche, la séquence au locus EF1 α a confirmé l'identité de C004 : *Alternaria alternata*. Les isolats C050 et C051 ont été identifiés antérieurement comme appartenant à l'espèce *Alternaria alternata*, et cette identification a été confirmée par l'analyse des séquences aux loci EF1 et GPD.

3.2. Interactions fongiques

3.2.1. Tests de confrontation sur milieu solide

La mesure de la croissance d'Abra43 a été faite trois semaines après le dépôt des explants de champignons sur milieu PDA (figure 5).

L'isolat *Epicoccum sp.* ABAI015 présente une forte capacité d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* avec 48% d'inhibition. D'autres isolats inhibent modérément la croissance d'*Alternaria brassicicola* : *Fusarium graminearum* ABAI065 (19%), *Epicoccum sp.* AI035 (14%), ainsi que les isolats d'*A. alternata* C050 (13%), C051 (13%) et NB42 (11%). *Cladosporium sp.* ABAI028 et *Alternaria alternata* C004 n'ont pas d'effet sur la croissance d'Abra43 (respectivement -2 et 2% d'inhibition de la croissance). Toutefois, il convient de nuancer ces résultats, dans la mesure où, à l'exception des confrontations avec *Epicoccum sp.* ABAI015 et *Fusarium graminearum* ABAI065, les colonies ne s'étaient pas suffisamment développées à la date où la mesure a été réalisée, pour pouvoir déterminer de façon fiable si un isolat a un pouvoir inhibiteur ou pas.

3.2.2. Test d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* par des filtrats de cultures fongiques

Les filtrats de culture ont un effet globalement faible sur la croissance d'Abra43 en milieu liquide : 15% d'inhibition au maximum (figure 6). Les filtrats de culture qui ont le plus fort effet inhibiteur sur la croissance d'Abra43 sont *A. alternata* C051 (15%) et C050 (12%), puis *Fusarium graminearum* ABAI065 (11%), *Epicoccum sp.* AI035 et ABAI015 (9% et 8% respectivement). *Cladosporium sp.* ABAI028 n'inhibe la croissance d'Abra43 que de 4%, et *Alternaria alternata* NB42 n'a aucun effet. En revanche, *Alternaria alternata* C004 stimule la croissance d'Abra43 de 20%.

3.2.3. Test de la capacité d'*A. alternata* à limiter la capacité de transmission d'*A. brassicicola* à la semence d'*A. thaliana*

Les résultats sur la figure 7 représentent la probabilité d'infection moyenne des graines d'*A. thaliana* par Abra43mcherrylns1.14 en fonction de l'isolat antagoniste présent, et prennent en compte les résultats obtenus sur 3 plantes par condition.

Le témoin négatif (siliques traitées avec une solution de Tween) présente une probabilité d'infection nulle, montrant ainsi l'absence de contamination par Abra43mcherrylns1.14. La probabilité d'infection des graines

par Abra43mcherrylns1.14 lorsqu'il est inoculé seul est de 0,67. Les isolats d'*Alternaria alternata* NB42 et C004 limitent de façon significative la transmission d'Abra43mcherrylns1.14 aux graines d'*A. thaliana* ($p < 2 \times 10^{-16}$). Une différence significative ($p = 1,66 \times 10^{-7}$) de probabilité de transmission d'Abra43mcherrylns1.14 est observée lorsqu'il est co-inoculé avec les isolats NB42 et C004, ce dernier limitant plus efficacement la transmission d'Abra43mcherrylns1.14 aux semences d'*A. thaliana* (0,14 de probabilité d'infection en cas de co-inoculation avec C004 contre 0,25 en cas de co-inoculation avec NB42).

4. Discussion

4.1. Identification moléculaire des isolats fongiques

L'identification des champignons est, depuis la mise au point de la PCR, largement basée sur l'utilisation de marqueurs moléculaires. L'utilisation des séquences ITS fait consensus dans la communauté des mycologues en tant qu'outil d'identification primaire. Mais l'identification des champignons sur la base de la séquence de l'ITS peut ne pas être complètement satisfaisante car les séquences ITS déposées dans les bases de données peuvent être incomplètes ou erronées. C'est pourquoi, à l'issue d'une identification primaire sur la base de la séquence ITS, une identification plus précise nécessite d'utiliser des marqueurs plus spécifiques d'un genre (Prakash *et al.*, 2017; Bessadat *et al.*, 2017).

Dans le cas présent, les 2 isolats C050 et C051, dont l'identité était inconnue avant le démarrage de ce travail, ont été identifiés sur la base de la séquence ITS comme appartenant au genre *Alternaria* et à l'espèce *alternata*. L'utilisation de marqueurs plus spécifiques aux champignons du genre *Alternaria*, GPD (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et EF1 α (facteur d'élongation 1 α) (Bessadat *et al.*, 2017), a confirmé l'appartenance à l'espèce *Alternaria alternata* de C050 et C051, de même que pour l'isolat C004 (identifié antérieurement à ce travail en tant qu' *Alternaria alternata* sur la base de la séquence ITS).

L'isolement de champignons appartenant à l'espèce *Alternaria alternata* à partir de semences de radis est cohérent avec le fait qu'*A. alternata* est une espèce ubiquiste, fréquemment isolée à partir d'une grande variété de plantes (Bessadat *et al.*, 2017), qui a un mode de vie essentiellement saprophyte (Lawrence *et al.*, 2008).

Les autres souches potentiellement antagonistes (excepté NB42, isolat de référence pour *Alternaria alternata* dans l'équipe (Bessadat *et al.*, 2017)) étudiées ici ont également été identifiées pour l'instant uniquement sur la base de la séquence ITS. Il serait intéressant de préciser leur identification en développant une approche multilocus, par l'utilisation des amorces GPD et TEF1 α , ainsi que des amorces spécifiques du gène la codant la tubuline. Le séquençage de ce locus est couramment utilisé pour identifier précisément les champignons appartenant aux genres *Cladosporium* (Bensch *et al.*, 2015), *Fusarium* (Karlsson *et al.*, 2016) et *Epicoccum* (Fávaro *et al.*, 2011).

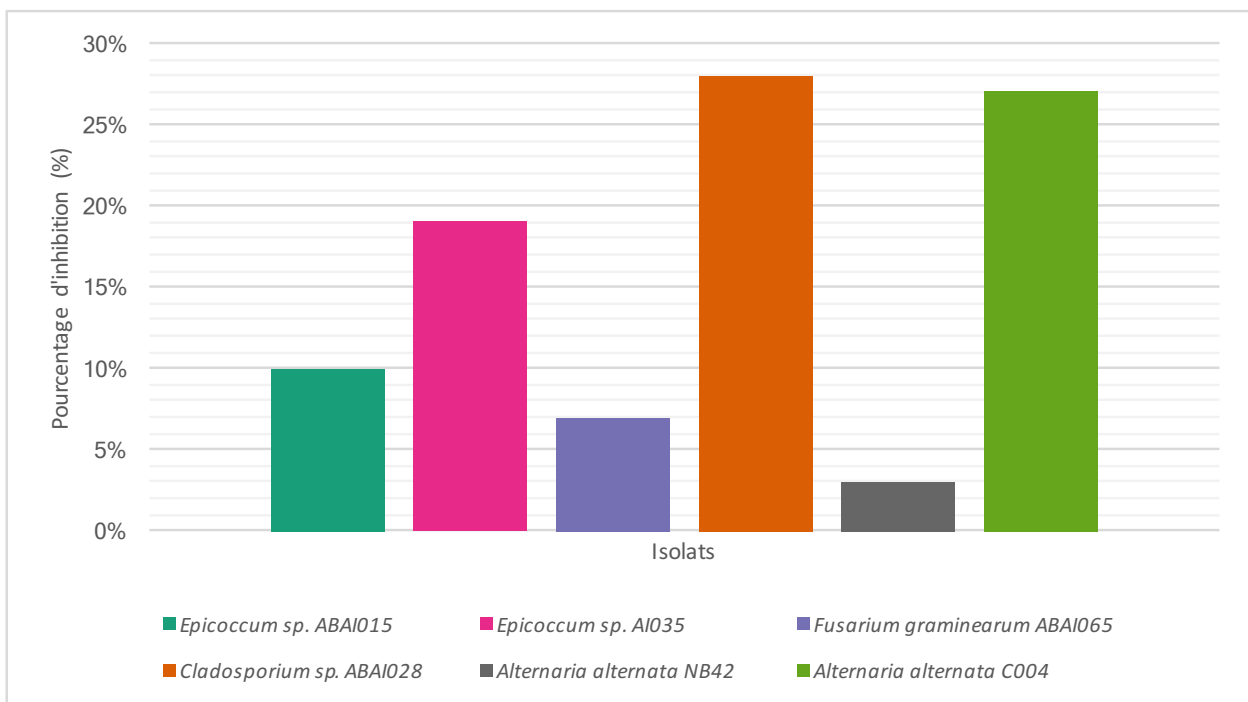


Figure 8 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* sur milieu solide (PDA) en fonction de l'isolat antagoniste testé (d'après Gastineau, 2017).

Une fois que cette approche multilocus aura été développée, y compris sur les autres isolats obtenus dans le cadre du projet MetaSEED, il conviendra d'analyser les séquences en comparaison avec des séquences de référence pour les différentes espèces de chaque genre, et de générer des arbres phylogénétiques.

4.2. Interactions fongiques *in vitro*

La durée de ce stage n'ayant pas permis de réaliser de répétitions des expérimentations de confrontation sur milieu solide et de test d'activité des filtrats de culture sur la croissance d'*A. brassicicola*, les résultats doivent donc être considérés avec précaution. L'ensemble de ces expérimentations devra être réitéré 2 fois afin de pouvoir effectuer des analyses statistiques.

En outre, pour ce qui est des confrontations sur milieu solide, les mesures ont été effectuées avant que les colonies d'Abra43 et celles des antagonistes ne soient devenues confluentes pour 6 isolats (*Cladosporium* sp. ABAI028, *Epicoccum* sp. AI035, *A. alternata* C050, C051, NB42 et C004). L'utilisation de boîtes de Petri carrées a été choisie pour se conformer à un protocole mis au point au laboratoire, mais l'utilisation de boîtes de Petri carrées est adaptée à la confrontation de champignons à vitesse de croissance élevée (ex. *Trichoderma* sp., *Botrytis* sp.). Pour répéter les expérimentations, sur les espèces à croissance plus lente étudiées ici, l'utilisation de boîtes rondes, plus petites, semble plus appropriée. Seuls les résultats obtenus avec *Epicoccum* sp. ABAI015 et *Fusarium graminearum* ABAI065 peuvent donc réellement être pris en compte. *Epicoccum* sp. ABAI015 se démarque des autres isolats par sa capacité à inhiber la croissance d'*A. brassicicola*, bien plus forte que celle des autres isolats. Ce résultat est cohérent avec des résultats précédents, qui ont montré que des espèces d'*Epicoccum*, comme *E. nigrum*, produisent des molécules issues du métabolisme secondaire (épilactone et épicoïculoïdes) capables de réduire la capacité de croissance d'autres espèces fongiques, notamment des espèces phytopathogènes (Brown *et al.*, 1987; Fávoro *et al.*, 2012; Talontsi *et al.*, 2013). Il est possible qu'*Epicoccum* sp. ABAI015 agisse par antibiose contre Abra43 par production de métabolites secondaires, mécanisme favorisé en milieu riche (ici PDA) (Heydari & Pessaraki, 2010). Cette hypothèse est d'ailleurs cohérente avec le fait que l'inhibition de la croissance d'Abra43 sur milieu PDA dilué déterminée antérieurement dans l'équipe est plus faible (10% (figure 8) ; Gastineau, 2017). En effet, sur milieu pauvre en ressources carbonées, la production de métabolites secondaires serait défavorisée (Heydari & Pessaraki, 2010).

Fusarium graminearum ABAI065 inhibe plus faiblement la croissance d'Abra43 que *Epicoccum* sp. ABAI015 (19% et 48%, respectivement). Une inhibition de la croissance d'Abra43 sur milieu PDA a précédemment été observée antérieurement par Gastineau (2017) (35%) alors que l'inhibition sur milieu PDA non dilué était très faible (7%) (figure 8), ce qui laisse penser que cet isolat agirait par production de métabolites secondaires, même si l'inhibition de la croissance d'Abra43 est relativement faible ici (11%). Il est connu que certaines

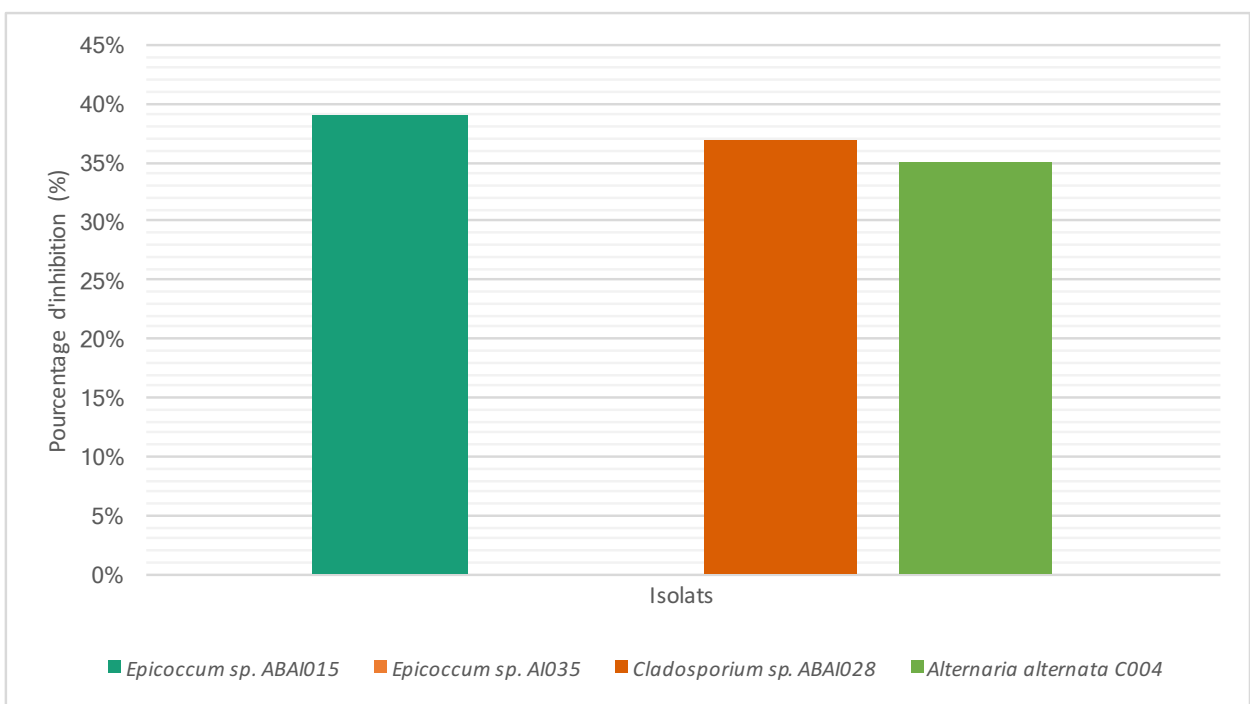


Figure 9 : Pourcentages d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* en fonction du filtrat de culture fongique testé (d'après Gastineau, 2017).

espèces de *Fusarium* sont capables de produire des molécules antifongiques (Alabouvette *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014).

Epicoccum sp. AI035 présente une activité d'inhibition de la croissance plus faible qu'*Epicoccum* sp. ABAI015. Cette différence de niveau d'activité entre isolats du même genre est cohérente avec ce qui a été décrit chez d'autres BCA potentiels. Dans la mesure où *Epicoccum* sp. AI035 et *Epicoccum* sp. ABAI015 ont produits des filtrats de culture avec le même niveau d'activité sur la croissance d'Abra43 en milieu liquide, il est possible que les 2 champignons présentent le même mode d'action, mais que l'activité antagoniste d'*Epicoccum* sp. AI035 n'ait pas eu le temps d'apparaître, du fait qu'une vitesse de croissance sur milieu solide plus faible que celle d'*Epicoccum* sp. ABAI015.

Les 4 isolats d'*Alternaria alternata* (C050, C051, NB42 et C004) ont une faible, voire très faible (C004), activité inhibitrice de la croissance d'Abra43 sur milieu solide. Le niveau d'inhibition par NB42 est très proche de celui qui a été identifié précédemment sur milieu PDA dilué (Gastineau, 2017). C050 et C051 ont une activité inhibitrice très proche de celle de NB42, et très proche l'une de l'autre (respectivement, 13,3, 12,7 et 9%). En revanche, l'activité inhibitrice de C004 est très faible, et beaucoup plus faible que celle qui a été mesurée antérieurement sur milieu PDA dilué (27% (figure 9) ; Gastineau, 2017). Ceci laisse supposer que C004 agit par compétition pour les ressources carbonées, type de mécanisme qui s'exprime lorsque les ressources sont limitées. Ceci indiquerait également que Abra43 et C004 ont utilisés les mêmes ressources trophiques, ce qui pourrait être étudié grâce au système FF MicroPlate™ (Biology, Hayward, Californie), qui consiste à déterminer quelles sources de carbone, d'azote, de soufre et de phosphore les champignons peuvent utiliser (Wang *et al.*, 2003). Le fait que l'inhibition de la croissance d'Abra43 par C004 repose sur un mécanisme de compétition est renforcée par le fait que le filtrat de culture de C004 n'exerce aucune activité inhibitrice de la croissance d'Abra43. Au contraire, le filtrat favorise la croissance d'Abra43. Toutefois, il convient, là encore, de considérer ce résultat avec prudence. En effet, lors d'une étude précédemment menée dans le laboratoire, le filtrat de culture produit par C004 inhibait la croissance d'Abra43 de 35%. Il semble donc que le filtrat de culture de C004 produit dans le cadre du présent travail, contenait une ou des substances favorisant la croissance d'Abra43. Si ce résultat était à nouveau observé lors des répétitions, une analyse biochimique de ce filtrat devrait être réalisée.

Ces manipulations ont mis en évidence des différences sensibles entre les isolats d'*Alternaria alternata* dans la capacité à limiter la croissance d'*A. brassicicola*. Ces variations au sein d'une même espèce ont déjà été décrites chez *Fusarium oxysporum* (Alabouvette *et al.*, 2009).

Le mode d'action de C004 pourrait être différent de celui des isolats *Alternaria alternata* C050 et C051, qui exercent une légère activité inhibitrice sur Abra43 en milieu liquide. L'isolat NB42 n'a pas non plus d'action inhibitrice par production de composés solubles sur la croissance en milieu liquide. L'hypothèse d'une inhibition par compétition pour expliquer la faible inhibition sur milieu solide semble peu probable car NB42 n'inhibait qu'à 3% la croissance d'Abra43 sur milieu PDA dilué (Gastineau, 2017). En revanche, il est possible que le filtrat de NB42 n'ait contenu aucun composé actif au moment de la récupération du filtrat. Il est en effet

possible que, au même titre qu'*Epicoccum sp.*, la production de métabolites secondaires puisse être fonction du temps de culture de l'isolat en milieu liquide (Brown *et al.*, 1987).

Enfin, *Cladosporium sp.* ABAI028 n'a eu, au stade auquel la mesure a été réalisée, aucune activité inhibitrice sur la croissance d'Abra43 en milieu solide. L'expérimentation n'ayant pas été menée à son terme dans le cas de *Cladosporium sp.* ABAI028, il n'est pas possible de conclure, d'autant plus qu'une activité inhibitrice de la croissance d'Abra43 (28% ; Gastineau, 2017) a été précédemment mise en évidence chez *Cladosporium sp.* ABAI028 sur milieu PDA dilué. Il a récemment été montré que *Cladosporium sp.* a une action antagoniste sur les champignons basée sur le parasitisme et par production d'enzymes de dégradation des parois fongiques (β -1,3-glucanases) (Torres *et al.*, 2017). Il n'est donc pas étonnant qu'aucune activité antagoniste n'ait été mise en évidence dans les conditions utilisées pour la confrontation sur milieu solide : la production d'enzymes lytiques est favorisée par les milieux de cultures pauvres (Heydari & Pessarakli, 2010) et le parasitisme nécessite le contact entre les 2 colonies de champignons (Hoch, 1977). L'inhibition de la croissance en milieu liquide d'Abra43 en milieu liquide (déjà précédemment observée, à un degré plus élevé : 36% (figure 9) Gastineau, 2017)) pourrait être due à la production d'enzymes lytiques.

Encore une fois, il sera nécessaire d'effectuer des répétitions biologiques afin de confirmer les résultats, et de mesurer la croissance d'Abra43 lorsque ses colonies seront devenues confluentes avec celles de tous les isolats antagonistes. Il serait aussi intéressant de déterminer si la conservation des filtrats à 4°C altère l'activité des filtrats en réitérant le test d'inhibition de la croissance *in vitro* après des durées de conservation croissantes.

4.3. Interactions fongiques *in planta*

La capacité d'*A. alternata* à limiter la transmission d'*A. brassicicola* à la semence a été testée par une co-inoculation de Abra43 avec chacun des deux isolats *A. alternata* NB42 et C004. Comme pour les autres expérimentations réalisées dans ce travail, il sera nécessaire de faire 2 répétitions biologiques pour confirmer les résultats obtenus, mais ceux-ci sont déjà relativement robustes, dans la mesure où chaque échantillon contenait 3 plantes, ce qui a permis de réaliser une analyse statistique.

A l'issue de l'expérience, il apparaît que les deux isolats d'*A. alternata* NB42 et C004 limitent significativement la capacité d'*A. brassicicola* à se transmettre aux graines. Les deux isolats ont diminué en effet d'environ deux tiers la probabilité de transmission d'Abra43. Dans le cas de l'isolat NB42, il s'agit de la confirmation d'un résultat obtenu à plusieurs reprises dans l'équipe (résultats non publiés). L'isolat C004 présente la même capacité, mais limite plus efficacement la transmission d'*A. brassicicola* que l'isolat NB42. Comme évoqué précédemment, des différences entre isolats d'une même espèce du point de vue de leur activité inhibitrice sur le développement d'un champignon *in planta* ont déjà été observées (Zhang *et al.*, 2014).

Il sera nécessaire de déterminer si *A. alternata* C004 est également capable de limiter le développement de symptômes au stade végétatif, en le co-inoculant avec Abra43 sur feuilles de chou, par exemple. La capacité d'*A. alternata* à limiter les symptômes d'une maladie a déjà été montrée avec la pourriture blanche du haricot (Boland & Hunter, 1988).

Boland et Hunter (1988) ont fait l'hypothèse qu'*A. alternata* agissait vraisemblablement par compétition et non par parasitisme ou antibiose. Dans le cas présent, les résultats obtenus tendent vers les mêmes conclusions que Boland et Hunter quant au mécanisme d'inhibition. En effet, d'une part, la compétition serait un mécanisme important dans les interactions entre les membres des communautés microbiennes associées aux semences (Rezki *et al.*, 2016). Et, d'autre part, comme cela a déjà été évoqué, l'isolat *A. alternata* C004 a une action inhibitrice de la croissance d'Abra43 sur milieu PDA dilué plus élevée que sur un milieu PDA non dilué.

Il serait intéressant de réitérer l'expérience avec les 2 autres isolats d'*A. alternata* C050 et C051 pour évaluer lequel serait le plus intéressant dans la limitation de la transmission à la semence d'Abra43, ainsi que d'autres représentants de l'espèce *A. alternata* isolés à partir des lots de semences récoltés dans le cadre du projet MetaSEED. En outre, l'adaptation du pathosystème utilisé ici pour tester l'effet d'*Epicoccum* sp. ABAI015 et *F. graminearum* ABAI065, les 2 isolats les plus efficaces au cours des expériences *in vitro*, pourrait être envisagée. *Cladosporium* sp. ABAI028 pourrait également être testé dans la mesure où ce genre est connu comme étant capable de se transmettre efficacement aux semences de *Cakile maritima* (famille des Brassicacées) (Oliver *et al.*, 2001). L'expérience pourrait aussi être réalisée en co-inoculant plus de deux souches sur les siliques, cela pourrait mettre en évidence des phénomènes de synergie ou d'inhibition entre les différents isolats.

Enfin, le rôle éventuel des composés de défense d'*A. thaliana* dans le déterminisme de la limitation de la transmission à la plante du pathogène par un saprophyte pourra être étudié. En effet, la sensibilité de champignons endophytes des racines de Brassicacées aux glucosinolates, famille de composés de défense essentiels chez les Brassicacées, influencerait fortement l'abondance de ces champignons dans le microbiote des racines (Szűcs *et al.*, 2018).

5. Conclusions et perspectives

L'objectif principal de ce stage était d'étudier la capacité d'isolats fongiques issus du microbiote de semences de radis à inhiber le développement d'*A. brassicicola*, ainsi que sa capacité à se transmettre aux semences d'*A. thaliana*.

L'identification moléculaire à l'aide de plusieurs marqueurs, réalisée sur 3 isolats, devra être étendue à l'ensemble des isolats étudiés ici, et, plus généralement à un panel plus larges d'isolats obtenus dans le cadre du projet MetaSEED, pour les identifier de façon plus fiable et plus précise.

En dépit du manque de répétitions biologiques dans les expériences menées, les tests d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola* sur milieux solide et liquide, ont permis d'identifier un isolat potentiellement utilisable en tant qu'agent de bio-contrôle : *Epicoccum* sp. ABAI015, qui appartient donc à un genre connu comme potentiellement intéressant pour contrôler les maladies des Brassicacées (Zhang *et al.*, 2014 ; Card *et al.*, 2015). *Fusarium graminearum* ABAI065 semble également présenter un potentiel d'inhibition de la croissance d'*A. brassicicola*, mais son caractère pathogène des Poacées (Karlsson *et al.*, 2016) rendrait son utilisation extrêmement délicate dans la lutte biologique.

Le résultat obtenu ici avec l'isolat *A. alternata* C004 est particulièrement prometteur, dans la mesure où il révèle une capacité à limiter la transmission d'*A. brassicicola* à la semence, une étape cruciale du cycle du black spot. La capacité d'*A. alternata* C004 à limiter la transmission d'*A. brassicicola* par la semence, c'est-à-dire à limiter la colonisation par *A. brassicicola* lors de la germination des graines, devra également être examinée. Si le résultat observé ici sur une plante-modèle se confirmait à l'avenir sur une plante d'intérêt agronomique (ex. le radis), la mise au point d'une méthode de lutte basée sur l'amélioration de la qualité sanitaire des semences pourrait être envisagée.

Les expérimentations ont mis en évidence des différences entre les isolats d'*A. alternata* pour ce qui est de la capacité à limiter le développement d'*A. brassicicola*. Il faudra donc tester d'autres isolats d'*A. alternata* obtenus dans le cadre du projet MetaSEED, de manière, d'une part, à déterminer si les effets observés sont généralisables, et d'autre part, s'il existe des isolats plus efficaces dans leur activité antagoniste vis-à-vis d'*A. alternata*.

Et enfin, la caractérisation des isolats présentant un potentiel d'utilisation en lutte biologique devra se poursuivre par une étude de leur capacité à sporuler (critère essentiel pour l'utilisation d'un champignon en tant que BCF (Fravel, 2005)), de leur sensibilité aux variations des conditions de l'environnement, et par l'étude de leurs effets éventuels sur les plantes appartenant à d'autres familles que les Brassicacées, sur l'homme (recherche de mycotoxines) et sur l'environnement.

6. Bibliographie

- Afkhami ME, Rudgers JA. 2008.** Symbiosis lost: imperfect vertical transmission of fungal endophytes in grasses. *The American Naturalist* **172**: 405–416.
- Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C. 2009.** Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* **184**: 529–544.
- Avenot H, Simoneau P, Iacomi-Vasilescu B, Bataillé-Simoneau N. 2005.** Characterization of mutations in the two-component histidine kinase gene *AbNIK1* from *Alternaria brassicicola* that confer high dicarboximide and phenylpyrrole resistance. *Current Genetics* **47**: 234–243.
- Barret M, Guimbaud J-F, Darrasse A, Jacques M-A. 2016.** Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms: plant microbiota affects seed transmission. *Molecular Plant Pathology* **17**: 791–795.
- Bensch K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, de Jesús Yáñez-Morales M, Crous PW. 2015.** Common but different: the expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology* **82**: 23–74.
- Berbee ML, Pirseyedi M, Hubbard S. 1999.** *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* **91**: 964.
- Bessadat N, Berruyer R, Hamon B, Bataille-Simoneau N, Benichou S, Kihal M, Henni DE, Simoneau P. 2017.** *Alternaria* species associated with early blight epidemics on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. *European Journal of Plant Pathology* **148**: 181–197.
- Boland GJ, Hunter JE. 1988.** Influence of *Alternaria alternata* and *Cladosporium cladosporioides* on white mold of bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **10**: 172–177.
- Brown AE, Finlay R, Ward JS. 1987.** Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* **19**: 657–664.
- Card SD, Hume DE, Roodi D, McGill CR, Millner JP, Johnson RD. 2015.** Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica* – A review. *Biological Control* **90**: 102–112.
- Dharmendra K, Neelam M, Yashwant KB, Ajay K, Kamlesh K, Kalpana S, Gireesh C, Chanda K, Sushil KS, Raj KM, et al. 2014.** *Alternaria* blight of oilseed Brassicas: a comprehensive review. *African Journal of Microbiology Research* **8**: 2816–2829.
- Di Pietro A. 1994.** Fungal antibiosis in biocontrol of plant disease. In: Inderjit, Dakshini KMM, Einhellig FA, eds. Allelopathy. Washington, DC: American Chemical Society, 271–279.
- Fávaro LC de L, de Melo FL, Aguilar-Vildoso CI, Araújo WL. 2011.** Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species (AP Litvintseva, Ed.). *PLoS ONE* **6**: e14828.
- Fávaro LC de L, Sebastianes FL de S, Araújo WL. 2012.** *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth (MR Liles, Ed.). *PLoS ONE* **7**: e36826.
- Fine PEM. 1975.** Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences* **266**: 173–194.

- Fravel DR. 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 337–359.
- Gastineau B. 2017.** *Existe-t-il des interactions entre Alternaria brassicicola et des champignons issus du microbiote des semences de radis?* Université d'Angers.
- Guillemette T. 2003.** Contribution à l'étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène d'*Alternaria brassicae*, l'agent du black spot des crucifères.
- Hansen LN, Earle ED. 1997.** Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **94**: 1078–1085.
- Heydari A, Pessaraki M. 2010.** A review on biological control of fungal pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* **10**: 273–290.
- Hoch HC. 1977.** Mycoparasitic relationships: *Gonatobotrys simplex* parasitic on *Alternaria tenuis*. *Phytopathology* **67**: 309–314.
- Hodgson S, de Cates C, Hodgson J, Morley NJ, Sutton BC, Gange AC. 2014.** Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution* **4**: 1199–1208.
- Iacomi-Vasilescu B. 2001.** Les champignons du genre *Alternaria* pathogènes des crucifères et transmis par les semences : identification moléculaire et analyse de la variabilité génétique.
- Islam MT, Hashidoko Y, Deora A, Ito T, Tahara S. 2005.** Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. Strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3786–3796.
- Jaklitsch WM, Voglmayr H. 2015.** Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* **80**: 1–87.
- Joubert A, Calmes B, Berruyer R, Pihet M, Bouchara J-P, Simoneau P, Guillemette T. 2010.** Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *BioTechniques* **48**: 399–404.
- Karlsson I, Edel-Hermann V, Gautheron N, Durling MB, Kolseth A-K, Steinberg C, Persson P, Friberg H. 2016.** Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples (D Cullen, Ed.). *Applied and Environmental Microbiology* **82**: 491–501.
- Leclere V, Bechet M, Adam A, Guez J-S, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P. 2005.** Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4577–4584.
- Mamgain A, Roychowdhury R, Tah J. 2013.** *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. **1**: 9.
- Nowicki M, Nowakowska M, Niezgodą A, Kozik E. 2012.** *Alternaria* black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. *Vegetable Crops Research Bulletin* **76**.
- Oliver EJ, Peter HT, Burdon JJ, Ash JE. 2001.** Vertical disease transmission in the Cakile–*Alternaria* host–pathogen interaction. *Australian Journal of Botany* **49**: 561–559.
- Pochon S. 2012.** Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des agents pathogènes aux semences d'*Arabidopsis thaliana*.
- Pochon S, Terrasson E, Guillemette T, Iacomi-Vasilescu B, Georgeault S, Juchaux M, Berruyer R, Debeaujon I, Simoneau P, Campion C. 2012.** The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: a model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant Methods* **8**:

16.

Prakash PY, Irinyi L, Halliday C, Chen S, Robert V, Meyer W. 2017. Online databases for taxonomy and identification of pathogenic fungi and proposal for a cloud-based dynamic Data network platform (CS Kraft, Ed.). *Journal of Clinical Microbiology* **55**: 1011–1024.

Rezki S, Campion C, Iacomi-Vasilescu B, Preveaux A, Toualbia Y, Bonneau S, Briand M, Laurent E, Hunault G, Simoneau P, et al. 2016. Differences in stability of seed-associated microbial assemblages in response to invasion by phytopathogenic microorganisms. *PeerJ* **4**: e1923.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 21–43.

Szűcs Z, Plaszkó T, Cziáky Z, Kiss-Szikszai A, Emri T, Bertóti R, Sinka LT, Vasas G, Gonda S. 2018. Endophytic fungi from the roots of horseradish (*Armoracia rusticana*) and their interactions with the defensive metabolites of the glucosinolate - myrosinase - isothiocyanate system. *BMC Plant Biology* **18**.

Talontsi FM, Dittrich B, Schüffler A, Sun H, Laatsch H. 2013. Epicoccolides : antimicrobial and antifungal polyketides from an endophytic fungus *Epicoccum* sp. associated with *Theobroma cacao* : polyketides from an endophytic fungus. *European Journal of Organic Chemistry* **2013**: 3174–3180.

Torres DE, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Guevara-Fefer P, Márquez-Guzmán GJ, Pérez-Martínez C. 2017. *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of chrysanthemum white rust (S Sarrocco, Ed.). *PLOS ONE* **12**: e0170782.

Vannacci G, Harman GE. 1987. Biocontrol of seed-borne *Alternaria raphani* and *A. brassicicola*. *Canadian Journal of Microbiology* **33**: 850–856.

Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1–14.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. Elsevier, 315–322.

Zhang Q, Zhang J, Yang L, Zhang L, Jiang D, Chen W, Li G. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control* **72**: 98–108.

Sitographie :

- 1) Présentation de l'IRHS : <https://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs/L-Institut>
- 2) RFI objectif végétal : <http://www.objectifvegetal.univ-angers.fr/fr/le-projet/les-objectifs.html>
- 3) SFR QUASAV : <https://www.sfrquasav-angers.org/Presentation-de-la-SFR-Quasav/Les-objectifs>
- 4) Présentation de l'équipe FungiSem : <https://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs/Recherche/Pathologies-fongiques-des-semences>
- 5) Ecophyto II : https://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf
- 6) NCBI - Blast : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

RÉSUMÉ

Parallèlement à la politique gouvernementale qui vise à réduire de moitié l'utilisation des produits chimiques dans l'agriculture, de nouvelles méthodes de gestion des agents pathogènes, appelées méthodes de lutte biologique, voient le jour. L'une d'entre elles consiste à améliorer la qualité sanitaire des semences en utilisant des agents de lutte biologique (BCA). La présente étude vise à caractériser le potentiel inhibiteur de 8 champignons isolés à partir de graines de radis sur la croissance d'*Alternaria brassicicola*, l'agent responsable des taches noires chez les *Brassicaceae*. La plupart des isolats présentent une activité inhibitrice de la croissance de *A. brassicicola* lors d'essais *in vitro*, mais un isolat d'*Epicoccum sp.* a montré un fort potentiel en tant qu'inhibiteur de la croissance d'*A. brassicicola* sur milieu solide. La co-inoculation des siliques d'*A. thaliana* avec *A. brassicicola* et *A. alternata* a révélé que l'isolat d'*A. alternata* C004 était capable de limiter significativement la transmission des graines de *A. brassicicola*. Ce travail est un progrès modeste dans l'identification de BCF potentiels, mais il pourrait ouvrir la voie dans l'identification des BCF les plus efficaces pour lutter contre *A. brassicicola*.

mots-clés : *Alternaria brassicicola* ; interactions fongiques ; saprophytes ; agents de bio-contrôle : transmission à la semence

ABSTRACT

Along with the governmental policy which aims to reduce by half the use of chemicals in agriculture, new methods of pathogen management, called biocontrol methods, are emerging. One of those consist in the improvement of the sanitary quality of seeds by using biocontrol agents (BCA). This study aims at characterizing inhibiting potential of 8 fungi isolated from radish seeds on the growth of *Alternaria brassicicola*, the black spot causal agent on *Brassicaceae*. Most of isolates exhibited an *A. brassicicola* growth inhibiting activity in *in vitro* tests, but, one *Epicoccum sp.* isolate showed a high potential for inhibition of *A. brassicicola* growth on solid medium. The co-inoculation of *A. thaliana* siliques with *A. brassicicola* and *A. alternata* revealed that the *A. alternata* C004 isolate was able to significantly limit *A. brassicicola* seed transmission. This work is a small progress in the identification of potential BCF, but it might pave the way to identify an effective BCF for *A. brassicicola* management.

keywords : *Alternaria brassicicola* ; fungal interactions ; saprophytes ; biocontrol agents ; seed transmission