



L'équipe FUNGISEM - Institut de Recherche en Horticulture et Semences adapte avec succès la solution de néphélométrie laser BMG LABTECH à ses besoins d'analyse haut-débit

L'équipe FUNGISEM de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences étudie la transmission des pathogènes fongiques aux semences et, en particulier, les processus d'adaptation des champignons phytopathogènes face aux contraintes environnementales.

Au cœur de cette dynamique de recherche, s'imposent de solides savoir-faire et des équipements de pointe, dont certains ont été précisément adaptés aux applications atypiques du Laboratoire. L'équipe FUNGISEM s'est ainsi tout particulièrement intéressée à la néphélométrie pour le suivi à haut-débit de la croissance des champignons filamenteux et s'est rapprochée de la société BMG LABTECH - leader dans le développement et la fabrication de lecteurs de microplaques - pour tester et ajuster la technologie à ce nouveau champ d'utilisation. Un bel exemple de partenariat dont témoignent aujourd'hui M. Thomas GUILLEMETTE - enseignant-chercheur au sein de l'équipe FUNGISEM - autour d'un équipement phare de la gamme BMG LABTECH : le Nephelostar Plus.

Au cœur de l'IRHS, Institut de Recherche en Horticulture et Semences

« L'équipe FUNGISEM a été officiellement fondée en janvier 2012, lors de la création de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS), mais elle trouve ses origines au sein de l'équipe CFN (Complexes Fongiques Nérotrophes) qui développait des thématiques proches depuis le début des années 2000 », explique M. GUILLEMETTE.

Basé à Angers/Beaucouzé, l'IRHS regroupe les principaux acteurs de la recherche angevine en biologie végétale, sous les tutelles de l'Inra, d'AGROCAMPUS-Ouest et de l'Université d'Angers. Les approches y sont intégratives, dans un cadre de mutualisation des ressources technologiques et des expertises. Généticiens, sélectionneurs, phytopathologistes, physiologistes, biochimistes, modélisateurs et statisticiens - soit plus de 230 personnes - y collaborent au sein de treize équipes, réparties dans trois grands pôles : Architecture et Floraison sur Rosiers et Autres Ornamentales - Qualité et Santé des Fruits et Légumes - Semences, Stress et Pathogènes.

Tous sont regroupés sur le même site où ils bénéficient de près de 9000 m² de laboratoires et 7000 m² de serres et chambres de culture, dont 360 m² de chambres climatiques offrant différents niveaux de confinement (S0, S1, S2 et S3) pour la manipulation d'organismes de quarantaine, de plantes et de micro-organismes génétiquement modifiés. L'IRHS accède par ailleurs à un parc instrumental des plus complets, dans le cadre notamment des six plates-formes et plateaux techniques mutualisés de la Structure Fédérative de Recherche QUASAV : Analyses des acides nucléiques, Imagerie cellulaire, Analyses phytochimiques, Phénotypage des semences et plantes, Collection des Microorganismes, et SensoVeg (analyse sensorielle).

Force motrice du pôle de compétitivité Végépolys, l'IRHS a désormais pour ambition d'atteindre et conforter une position internationale de pointe sur les questions fondamentales et stratégiques de la biologie des produits du « végétal spécialisé », en contribuant à terme au développement de méthodes de lutte innovantes ou à l'amélioration de la résistance aux maladies. Depuis sa création, l'Institut investit ainsi continuellement dans le développement d'approches émergentes, telles que génomique, métagénomique, épigénétique,

bioinformatique et phénotypage haut-débit, pour évoluer vers une biologie prédictive et renforcer ses capacités d'innovation. Ses équipes ont d'ailleurs emménagé en 2015 dans de nouveaux laboratoires et complexes de serres sur le « Campus du Végétal » où a récemment été inaugurée une nouvelle plateforme de phénotypage dédiée à l'étude de la physiologie des semences et des interactions hôtes-pathogènes d'espèces horticoles.

FUNGISEM, de la mycologie à la génomique fonctionnelle

FUNGISEM, équipe du Pôle Semences, Stress et Pathogènes de l'IRHS, est constituée d'une quinzaine de personnes dont six enseignants-chercheurs, trois techniciens et trois doctorants. Spécialistes de la microbiologie et de la pathologie végétale, ils étudient la transmission à et par la semence, étape critique dans l'écologie de nombreux champignons phytopathogènes et dans l'épidémiologie des maladies qu'ils occasionnent.

« Les mécanismes moléculaires impliqués dans la contamination de la semence, puis dans l'infection de la plantule, demeurent encore largement méconnus », explique Thomas GUILLEMETTE. « Nous cherchons donc à identifier des déterminants du pouvoir pathogène, notamment ceux liés à la protection du champignon contre les stress physico-chimiques auxquels il fait face lors de l'interaction avec sa plante-hôte. Une attention particulière est portée à la phase de transmission à et par la semence, en prenant en compte les deux partenaires de l'interaction, ainsi que le microbiome associé à la semence. »

Les études conduites à FUNGISEM utilisent principalement pour modèles les espèces pathogènes du genre *Alternaria* transmises par les semences de Brassicacées et d'Apiacées. Les champs d'expertise de son équipe s'étendent de la pathologie végétale, à la mycologie et la génomique fonctionnelle. « Nous initiions également des travaux en lien avec le biocontrôle dans le but de réduire l'utilisation des pesticides », ajoute M. GUILLEMETTE.

L'équipe FUNGISEM finance ses recherches au travers de plusieurs projets, tels que le projet GreenProtect du Fonds Unique Interministériel (FUI), le projet Nabuco du Ministère de l'Agriculture ou encore le projet Estim - ANR Labcom avec AREXHOR Pays de la Loire, et s'implique par ailleurs dans divers contrats ou prestations de service auprès de partenaires académiques et entreprises du secteur végétal.

« Dans le cadre de nos travaux sur le suivi haut-débit de la croissance des champignons filamenteux, nous avons été amenés à collaborer avec la société BMG LABTECH », nous confie Thomas GUILLEMETTE. Plusieurs techniques de mesure telles que la fluorescence et l'absorbance existaient déjà, mais ne donnaient pas totale satisfaction, du fait notamment de biais générés par les variations d'intensité des longueurs d'onde et d'un manque de sensibilité. « Nous nous sommes donc intéressés à la néphélométrie et nous sommes rapprochés de la société BMG LABTECH que nous connaissons déjà depuis 2008 pour avoir acquis plusieurs équipements de la marque », ajoute l'enseignant-chercheur. « Deux lecteurs de microplaques SPECTROSTAR Nano, deux NEPHELOSTAR et deux Nephelostar Plus équipent aujourd'hui notre laboratoire. »

Sensibilité, fiabilité, miniaturisation et rapidité des mesures en néphélométrie

« En partenariat avec BMG LABTECH, nous



Anthony Kwasiborski, Bruno Hamon, Élodie Belmas et Thomas Guillemette

avons ainsi cherché à tester et adapter à nos travaux sur les champignons filamenteux la néphélométrie laser, technique qui jusque-là n'était pas reconnue pour ce type d'applications », poursuit M. GUILLEMETTE. « Notre choix s'est porté sur un équipement phare de la marque, le Nephelostar Plus, lecteur de microplaques pour les mesures en néphélométrie, solubilité et turbidité. »

« La néphélométrie est une technique de mesure de la teneur de particules en suspension ou de la turbidité d'un milieu, basée sur la dispersion de la lumière. Elle consiste à mesurer la lumière diffusée à 90° d'angle par rapport à la lumière incidente », complète M. Sami BEN LAMINE. « Le Nephelostar Plus est compatible avec tous les formats de microplaques de 6 puits à 384 puits. Il est équipé d'un laser ajustable en hauteur et permet également l'incubation entre la température ambiante et 45°C, sur des cinétiques longues ou sur des mesures ponctuelles. Son atout principal est sa sensibilité, vingt fois supérieure aux mesures en absorbance. »

Un autre point fort de la solution BMG LABTECH concerne la miniaturisation des mesures en néphélométrie, avec la possibilité de traiter jusqu'à 96, voir 384 échantillons en même temps. « Le Nephelostar Plus étant équipé d'un robuste système d'agitation et d'une incubation uniforme, il permet par ailleurs des mesures en cinétique sur plusieurs jours de lecture », ajoute M. BEN LAMINE. « L'ajustement de la hauteur focale et de la surface de lecture favorise toute sorte de mesures, également celles d'éléments les plus complexes. Les marchés visés sont ceux de la croissance microbienne, le screening de drogues solubles et la quantification de protéines... »

Une adaptation réussie du Nephelostar Plus au suivi au-débit de la germination et de la croissance de champignons filamenteux

L'objectif de M. GUILLEMETTE précisément était d'adapter l'utilisation du Nephelostar Plus au suivi de la germination et de la croissance de champignons filamenteux, en présence ou non d'inhibiteurs ou de conditions stressantes. Objectif atteint grâce à une collaboration efficace avec l'équipe BMG LABTECH !

Plusieurs paramètres et fonctionnalités du Nephelostar Plus ont été modifiés et optimisés pour répondre aux besoins de l'équipe FUNGISEM : augmentation de la durée des cycles de mesure, adaptation des paramètres d'agitations et du temps de lecture, gamme dynamique et facilité d'utilisation avec le lancement d'un protocole en un clic. « Nos ingénieurs informatique développent par ailleurs un logiciel spécifique pour implémenter sous le logiciel MARS Data Analysis, les calculs que l'équipe FUNGISEM réalise jusqu'à lors sous Excel », ajoute M. BEN LAMINE.

« Grâce au Nephelostar Plus, nous sommes aujourd'hui en mesure de tester un grand nombre d'échantillons (une trentaine) en seulement 30h dans un petit volume, ce qui permet d'utiliser des petites quantités d'inhibiteurs parfois précieux », précise M. GUILLEMETTE. « La technique s'avère

donc très adaptée aux stratégies de criblage ou de phénotypage. Les données peuvent être facilement traduites en données mathématiques et notamment en pourcentage d'inhibition. »

« Nous focalisons une partie de nos travaux désormais sur l'étude de solutions de biocontrôle », poursuit le chercheur. « Le néphélomètre est particulièrement intéressant dans ce cadre pour tester l'effet de métabolites naturels sur la croissance de divers pathogènes fongiques. Nous cherchons également à adapter cette technique au suivi de la germination de graines pour la recherche, par exemple en présence de biostimulants. »

La collaboration entre les équipes FUNGISEM et BMG LABTECH se poursuit donc avec la même dynamique et cette priorité toujours pour BMG LABTECH de se positionner au plus près des utilisateurs, pour accompagner la mise en œuvre de leurs applications et leur garantir un suivi performant.

Toujours dans cette optique de collaboration étroite, l'utilisation de la Néphélométrie en microplaques s'est étendue récemment sur les algues et les micro-organismes avec de très bons résultats...

Pionnière et leader dans la conception de lecteurs de microplaques, l'entreprise propose une gamme de solutions adaptées aux applications les plus variées : fluorescence (intensité, temps résolu, HTRF® (marque déposée de la société Cisbio international), polarisation de fluorescence et FRET), absorbance (y compris UV), luminescence (BRET, Flash et Glow) et néphélométrie... et ce, dans tous les formats de plaques, de 6 à 384 puits. De la R&D du Groupe, naissent régulièrement de nouvelles solutions technologiques, à l'exemple du PHERASTAR FSX, appareil multidétection introduit sur l'Hexagone en février dernier, qui allie le très haut screening en fluorescence, luminescence, absorbance et polarisation de fluorescence, à la meilleure sensibilité du marché. L'équipe s'est par ailleurs enrichie depuis peu en France d'un nouveau technicien SAV, afin de renforcer toujours plus ses services et notamment ses contrats de maintenance.

Pour en savoir plus :

UMR 1345 - Institut de Recherche en Horticulture et Semences - Equipe FUNGISEM

Mr Thomas GUILLEMETTE

Tél. : 02 41 22 57 82

thomas.guillemette@univ-angers.fr

<https://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs>

Publication :

<http://www.biotechniques.com/BiotechniquesJournal/2010/May/Laser-nephelometry-applied-in-an-automated-microplate-system-to-study-filamentous-fungus-growth/biotechniques-239546.html>

BMG LABTECH

Tél. : 01 48 86 20 20

[france@bmglabtech.com](http://www.bmglabtech.com)

<http://www.bmglabtech.com>