

Détermination du pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans* sur tubercules de pomme de terre par analyse d'image avec le logiciel ImageJ

Alexander Kröner¹, Claudine Pasco¹

Résumé : Nous décrivons une méthode de détermination du pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans* sur tubercules de pomme de terre par analyse d'image avec le logiciel ImageJ. Elle est utilisée dans l'UMR 1099 BiO3P pour établir un classement de résistance partielle entre des variétés de pomme de terre. Ce classement intervariété est basé sur la sévérité des symptômes obtenus après inoculation artificielle des tubercules entiers avec le pathogène. Il est une composante importante pour l'étude de la résistance partielle.

Mots clés : Oomycète, agressivité, résistance partielle, inoculation artificielle, classement inter-variété

Introduction

Phytophthora infestans est un oomycète qui provoque le mildiou chez la pomme de terre. Il a été à l'origine de la grande famine en Irlande au 19^e siècle et représente toujours un risque majeur pour les rendements. A l'heure actuelle, la maîtrise des pertes de rendements est insuffisante et basée pour une grande partie sur une application massive de produits chimiques avec des effets potentiellement nuisibles pour l'environnement et la santé humaine. Le plan Ecophytoto 2018, qui a émergé du Grenelle de l'environnement, prévoit de réduire de 50% l'usage des pesticides au niveau national dans un délai de dix ans. Pour y arriver tout en préservant la quantité et la qualité des rendements, il est nécessaire de développer des alternatives à la lutte chimique dans la protection des plantes. Les variétés de pomme de terre présentent des niveaux de résistance variables et parfois élevés vis-à-vis du mildiou de la pomme de terre. L'étude des mécanismes souvent mal connus associés à cette résistance naturelle, est potentiellement utile pour le développement des méthodes innovantes de protection de la pomme de terre contre le mildiou. Elle comprend l'étape du classement des variétés selon leurs niveaux de résistance. L'expression phénotypique de la résistance peut être évaluée en quantifiant les symptômes provoqués par le pathogène. Etant donné que les symptômes provoqués par *P. infestans* sont très souvent diffus dans la chair des tubercules,

¹ UMR 1099 Biologie des organismes et des populations appliquée à la protection des plantes INRA, Agrocampus Ouest, F-35653, Le Rheu, France, claudine.pasco@rennes.inra.fr, ☎ 02 23 48 59 10

une appréciation visuelle de ces symptômes n'est que semi-quantitative et variable en fonction de l'expérimentateur. La méthode présentée ici est basée sur celle décrite par Niemira *et al.* (1999) et Colon *et al.* (2004). Elle comprend l'inoculation artificielle des tubercules avec *P. infestans* suivie de la quantification des symptômes par analyse d'image qui nous permet de surmonter ces limitations.

1 Matériel et méthodes

1.1 Matériel

- Souches de *P. infestans* repiquées sur boîtes de Petri contenant du milieu Petit Pois (Montarry *et al.*, 2007)
- Tubercules de pomme de terre des variétés à tester, conservés après la récolte à 4°C
- Folioles de pomme de terre de la variété Bintje, obtenues après 4 semaines de culture sous conditions contrôlées
- Boîtes de Petri (ø 9 cm) contenant de l'eau gélosée à 1.5 % (g/v)
- Tubes Falcon de 15 et 50 mL
- Pipettes Pasteur recourbées sur la flamme sous forme de râteau
- Cellule de Malassez (profondeur 0,2 mm)
- Terrines en polystyrène (45 cm x 30 cm x 8 cm)
- Papier absorbant
- Grilles pour éviter le contact des tubercules avec le papier absorbant humide
- Eau distillée stérile
- Couteau
- Brumisateur (Eco-Spray, Code 44151421, <http://www.cloup.fr>)
- Enceinte climatisée munie d'un éclairage
- Ordinateur portable
- Scanner à plat (ici Epson Perfection 1260)
- Bandelette regroupant une gamme des niveaux de gris (Stouffer, R2110C 21 Step Reflection Guide 3/4" x 7 1/4" Calibrated, www.stouffer.net)
- Logiciels libres à télécharger:
 - GIMP (<http://www.gimp.org>)
 - ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov>)

1.2 Préparation d'inoculum de *P. infestans* sur folioles de pomme de terre de variété Bintje

La suspension de sporanges utilisée pour inoculer les tubercules de pommes de terre est produite sur folioles de pommes de terre, ceci afin de réactiver son pouvoir pathogène.

1.2.a Préparation de la suspension de sporanges de *P. infestans*

La suspension de sporanges est préparée à partir d'une culture de *P. infestans* âgée de 3 semaines en boîte de Petri. Quatre mL d'eau stérile sont déposés sur cette culture. L'eau est ensuite étalée sur toute la surface avec un râteau (préparé à partir d'une pipette Pasteur) pour mettre les sporanges en suspension. La suspension obtenue est transférée dans un tube Falcon de 15 mL. Les sporanges sont comptés à l'aide d'une cellule de Malassez et la suspension est

ajustée à la concentration de 50 000 sporanges.mL⁻¹. L'inoculum ainsi obtenu est stocké à 4 °C pendant 2 h pour libérer les zoospores des sporanges.

1.2.b Préparation des folioles

Les folioles sont prélevées sur des plantes de pomme de terre, cv Bintje. Ces folioles sont choisies sur différentes plantes et à différentes hauteurs sur la plante pour obtenir un échantillon représentatif. Les folioles sont ensuite déposées, face inférieure vers le haut dans le couvercle de boîtes de Petri retournées à raison de 2 folioles par boîte. Les boîtes de Petri renferment de l'eau gélosée (1,5 %) pour garantir une ambiance saturée en eau.

1.2.c Inoculation des folioles

Après libération des zoospores, 3 gouttes de 20 µL de suspension sont déposées au centre de la foliole après avoir légèrement blessé celle-ci avec le cône de la pipette. Les folioles inoculées sont incubées pendant 7 jours en enceinte climatique réglée à 8 h d'obscurité (15 °C) et 16 h de lumière (18 °C). Les folioles inoculées développent des symptômes d'aspect huileux qui brunissent rapidement et s'entourent d'un liseré clair à la surface supérieure du limbe. La fructification de *P. infestans* est abondante et se présente sous forme d'un duvet blanc (sporangiophores, porteurs de sporanges).

1.2.d Préparation de l'inoculum final à partir des folioles inoculées

Une foliole bien fructifiée est plongée dans un tube Falcon de 50 mL contenant 10 mL d'eau stérile. Le tube est agité doucement pour mettre en suspension les sporanges. La suspension de sporanges ainsi obtenue est calibrée à l'aide d'une cellule à Malassez puis ajustée à la concentration de 50 000 sporanges.mL⁻¹ avec de l'eau stérile. Cette suspension est ensuite stockée à 4 °C pendant 2 h pour libérer les zoospores des sporanges.

1.3 Préparation des tubercules

Les tubercules destinés à l'inoculation sont soigneusement lavés à l'eau courante en utilisant une éponge. Ils sont ensuite désinfectés dans l'éthanol à 70 % par trempage pendant 5 min puis rincés dans de l'eau stérile pendant 5 minutes pour éliminer l'éthanol. Après avoir été séchés avec du papier absorbant, ils sont placés sur un grillage dans des terrines dont le fond a été recouvert de papier absorbant (**figure 1**). Ce papier est humidifié uniformément avec 100 mL d'eau distillée stérile et les terrines sont recouvertes d'un plateau pour maintenir une humidité saturante. Une incubation en chambre climatisée à 17°C pendant 24 h permet l'ouverture des lenticelles, sites de pénétration pour *P. infestans*.



Figure 1 Dispositif expérimental.

1.4 Inoculation des tubercules

L'inoculation avec *P. infestans* est réalisée sur tubercules entiers à l'aide d'un brumisateur de type Eco-Spray (**figure 2**). En



Figure 2 Brumisateur Eco-Spray.

moyenne, 1 mL d'une suspension de sporanges est inoculé par tubercule en prenant soin de retourner les tubercules en cours d'inoculation pour atteindre leur face inférieure. Le couvercle est refermé et les terrines sont incubées à 17°C pendant 15 jours. Les symptômes se manifestent par l'apparition de tâches superficielles irrégulières, violacées ou brunes à l'extérieur et de couleur rouille/noir à l'intérieur.

1.5 Numérisation des symptômes

Les symptômes provoqués par *P. infestans* à l'intérieur des tubercules sont numérisés avec un scanner à plat. Les tubercules sont d'abord découpés en tranches transversales d'une épaisseur de 1cm afin de visualiser les symptômes internes (**figure 3**). Ensuite, deux tranches prélevées de chaque côté du tubercule sont placées sur le scanner et numérisées avec une résolution de 300 dpi. Les extrémités et la tranche centrale d'épaisseur variable ne sont pas utilisées. Une bandelette regroupant une gamme de niveaux de gris sert de témoin de calibration. Le fichier est enregistré en format jpeg.

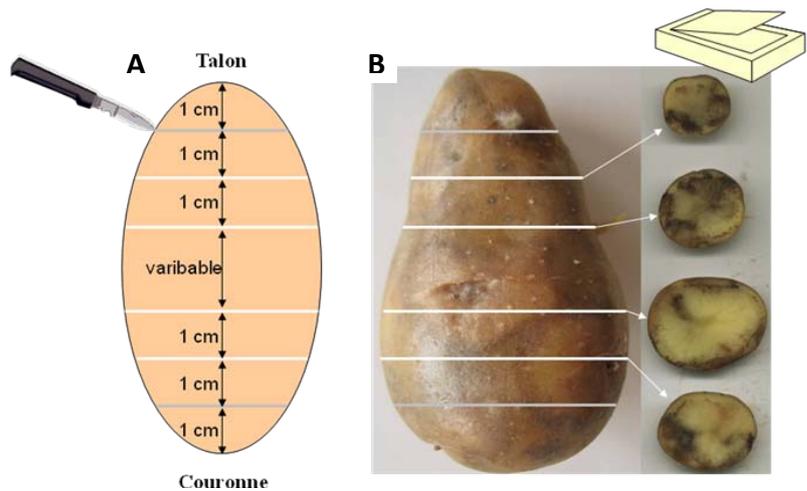


Figure 3 Schéma de coupe d'un tubercule (A) et symptômes sur tubercule (B).

1.6 Préparation des fichiers

Le fond gris autour des tranches numérisées est remplacé par un fond blanc pour faciliter par la suite l'analyse d'image en utilisant le logiciel GIMP. Il est conseillé de ne pas faire les modifications sur les fichiers originaux mais plutôt de travailler sur des copies.

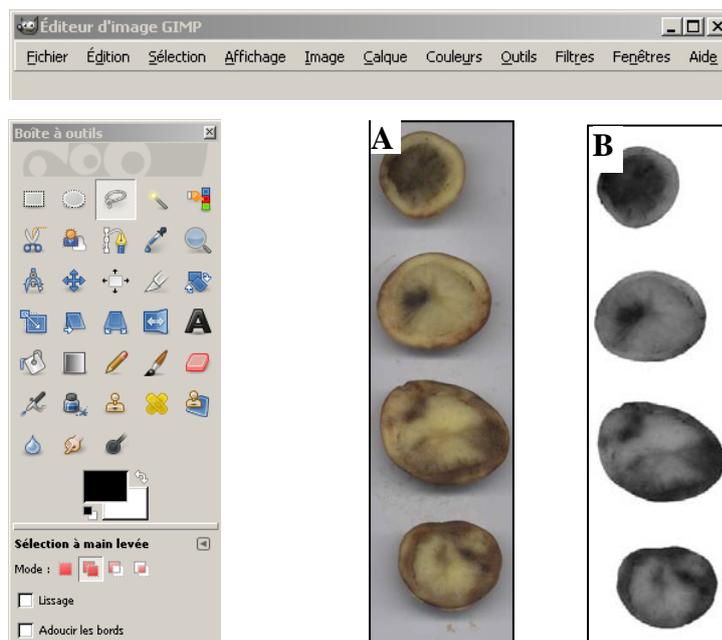


Figure 4 Exemple d'un scan avant (A) et après (B) traitement d'image avec le logiciel ImageJ

Un premier fichier est ouvert avec le logiciel GIMP (**figure 4 A**).

L'outil de sélection à main levée en mode « Ajouter à la sélection courante » est utilisé pour sélectionner successivement les surfaces des tranches. La taille de la sélection est réduite de 10 pixels avec la fonction « Réduire » dans le menu « Sélection » pour prendre en compte les effets de bordure.

L'outil de sélection rectangulaire est ensuite utilisé en mode « Ajouter à la sélection courante » pour sélectionner la bandelette

regroupant une gamme de niveaux de gris. La fonction « Inverser » dans le menu « Sélection » est utilisée pour inverser la sélection afin de sélectionner le fond au lieu des surfaces des tranches. Suite à l'activation de la touche « Supprimer » sur le clavier de l'ordinateur, le fond gris est remplacé par la couleur d'arrière plan, à définir au préalable comme « blanc » dans la boîte à outils. Dans le menu « Image », le « Mode » « Niveaux de gris » est sélectionné pour convertir le fichier couleur en niveaux de gris. Le fichier est alors prêt pour l'analyse d'image, il est enregistré en format jpeg (Fichier 4, B).

1.7 Calibration

Le rendu des niveaux de gris dépend du scanner utilisé pour la numérisation des tranches et du logiciel utilisé pour la transformation des couleurs en niveaux de gris. Une calibration avec une bandelette regroupant une gamme de 21 niveaux de gris permet de standardiser ce rendu en traduisant les valeurs de gris en densité optique. Plus il y a de symptômes (taches sombres) provoquées par *P. infestans*, plus la densité optique de la surface des tranches est importante.

Un premier fichier regroupant les tranches de pomme de terre et la bandelette regroupant une gamme de niveaux de gris est ouvert avec le logiciel ImageJ (**figure 5**).

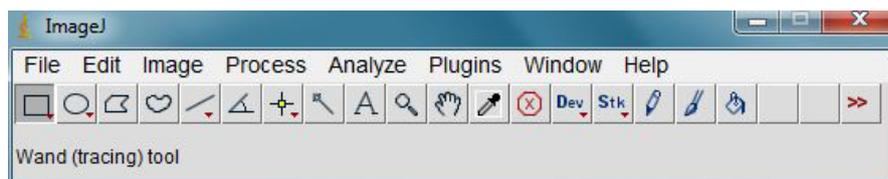


Figure 5 Environnement graphique du logiciel ImageJ.

Le type de mesures à prendre en compte par le logiciel est précisé dans la fenêtre de dialogue « Set Measurements » qui se trouve dans le menu « Analyze ». Seule la case « Mean grey value » doit être cochée pour la mesure du niveau de gris moyen. Le niveau de gris le plus clair de la bandelette est sélectionné avec l'outil de sélection rectangulaire (Rectangular selection) qui se trouve dans la barre d'outils. Une première mesure est prise en activant la touche « m » du clavier. Les autres niveaux de gris plus sombres sont déterminés de la même manière. La distinction entre les niveaux de gris les plus sombres est rendue possible par un ajustement de l'affichage des contrastes (Image > Adjust > Brightness/Contrast). La barre « Maximum » est décalée vers la gauche autant que nécessaire. Les mesures sont prises et la fenêtre de dialogue est fermée sans enregistrer les modifications effectuées. Les niveaux de gris affichés sont enregistrés dans la mémoire vive de l'ordinateur (Edit > Select All > Copy) puis insérés dans la partie gauche du tableau de calibration (Analyze > Calibrate). Les valeurs de densité optique correspondantes (notées sur l'emballage de la gamme des niveaux de gris) sont insérées dans la partie droite. La fonction « Rodbard » est choisie dans le menu déroulant comme méthode d'intégration. La case « Global calibration » est cochée de manière à ce que la calibration soit appliquée sur l'ensemble des mesures. Après avoir cliqué sur OK, la courbe de régression s'affiche (**figure 6, A**).

1.8 Mesures

Deux mesures différentes sont à réaliser sur les tranches : la surface (nombre de pixels) et la densité optique intégrée (cumul des densités optiques de chaque pixel). Ceci est à préciser dans la fenêtre de dialogue « Set Measurements » qui se trouve dans le menu « Analyze » en cochant les cases « Area » (surface) et « Integrated density » (densité optique intégrée). La surface d'une première tranche est ensuite sélectionnée avec l'outil « Wand (tracing) tool » qui se trouve dans la barre d'outils. Une fois l'outil sélectionné, un clic gauche avec la souris de l'ordinateur sur un endroit situé à proximité de la tranche fait apparaître une sélection autour de la tranche (**figure 6, B**). Les mesures sont prises en activant la touche « m » du clavier. Les autres tranches sont sélectionnées et mesurées les unes après les autres. Les valeurs affichées dans la fenêtre Results (**figure 6, C**) sont enregistrées dans la mémoire vive de l'ordinateur (Edit > Select All > Copy) puis importées dans un fichier Excel en utilisant les paramètres par défaut de son assistant d'importation. La densité optique moyenne est ensuite calculée en divisant la surface (Area) par le cumul des densités optiques (Integrated Density). Les valeurs obtenues pour les tubercules Témoin sans symptômes sont soustraites des valeurs des tubercules inoculés afin d'obtenir la densité optique provoquée par *P. infestans*. Cette mesure représente la sévérité des symptômes.

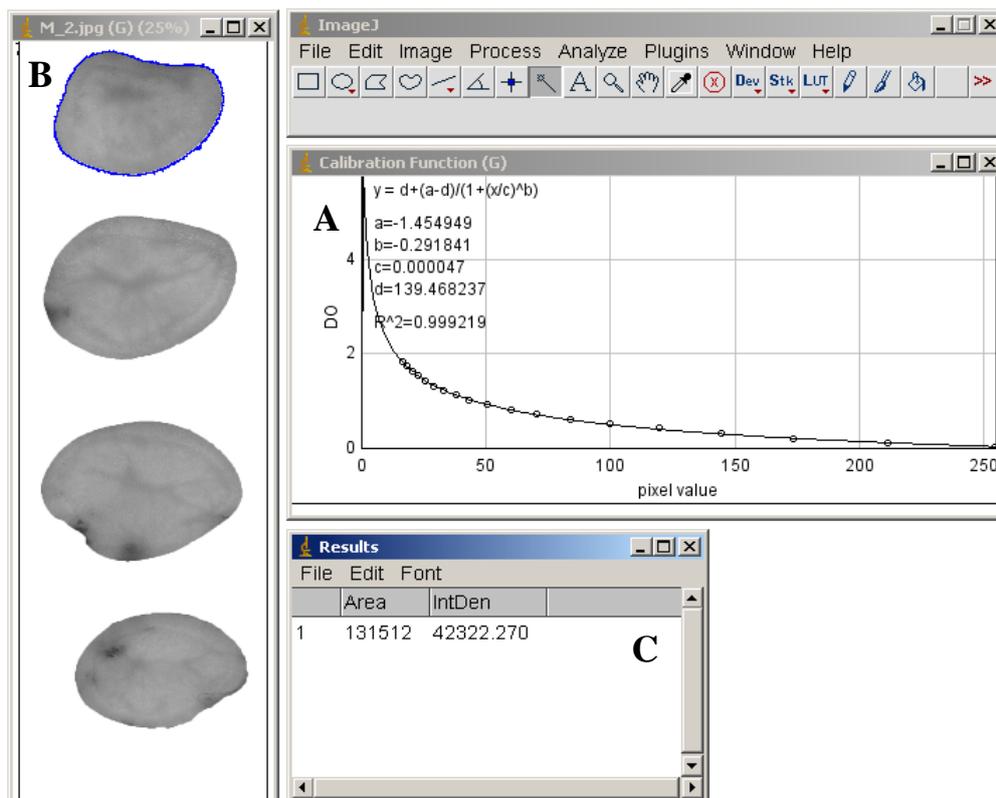


Figure 6 Le logiciel ImageJ avec les fenêtres suivantes: la courbe de calibration (A), le fichier contenant les tranches de tubercules avec une première tranche sélectionnée et le tableau des résultats (C).

2 Exemple d'application

La détermination du pouvoir pathogène de *P. infestans* sur tubercules de plusieurs variétés de pomme de terre permet de classer les variétés suivant leurs niveaux de résistance (**figure 7**). La sévérité des symptômes qui est exprimée en « densité optique » est la plus élevée pour la variété BF15 (bf). En conséquence, cette variété est considérée comme la moins résistante. Les variétés Bintje (bi) et Kerpondy (ke) montrent des niveaux de résistance intermédiaires tandis que les variétés Ackersegen (ac) et Saturna (sa) présentent un niveau de résistance le plus élevé par rapport aux variétés testées. Ce classement obtenu est globalement conforme à celui publié par SASA (Science and Advice for Scottish Agriculture) sur le site www.europotato.org à l'exception de la variété Kerpondy.

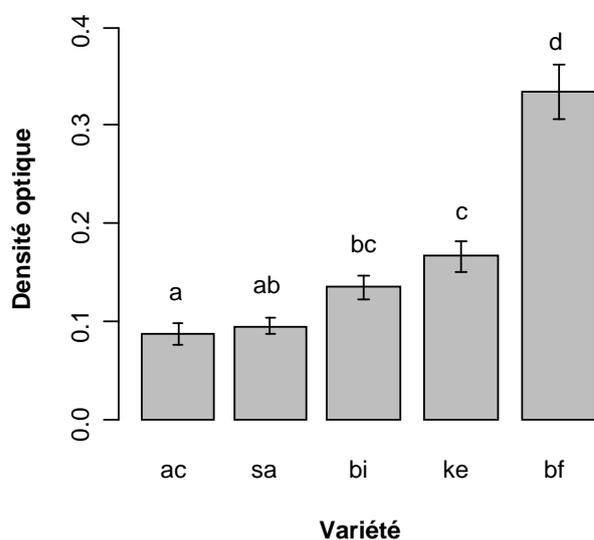


Figure 7 Test du pouvoir pathogène de *Phytophthora infestans*. Les variétés testées sont Ackersegen (ac), BF15 (bf), Bintje (bi), Kerpondy (ke) et Saturna (sa). Moyenne \pm erreur standard. Les différentes lettres indiquent les moyennes qui sont significativement différentes (Test Tukey, $p < 0,05$).

3 Conclusions et perspectives

La détermination du pouvoir pathogène de *P. infestans* sur tubercules de pomme de terre par analyse d'image est utilisée depuis plusieurs années pour évaluer de manière reproductible le niveau de résistance partielle des variétés de pomme de terre. Cette technique peut être étendue à l'évaluation du comportement de tubercules de pomme de terre vis-à-vis d'autres pathogènes dont les symptômes de maladie se manifestent par une décoloration des tissus.

4 Références bibliographiques

Colon L, Nielsen BJ, Darsow U (2004) Whole tuber test for tuber blight resistance, http://www.eucablight.org/Lib/Eucablight/Protocol/WholeTuber_V12.pdf, page consultée le 4 juillet 2011.

Montarry J, Corbiere R, Andrivon D (2007) Is there a trade-off between aggressiveness and overwinter survival in *Phytophthora infestans* ? *Functional Ecology* 21: 603-610.

Niemira BA, Kirk WW, Stein JM (1999) Screening for late blight susceptibility in potato tubers by digital analysis of cut tuber surfaces, *Plant Disease*, 83 (5) : 469-473.