

Microscopie électronique à balayage de *Penicillium italicum* sur des oranges traitées au R-23979, un dérivé de l'imidazole.

J. VAN GESTEL et J. VAN REEMPTS*

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE
DE *PENICILLIUM ITALICUM* SUR DES ORANGES TRAITEES
AU R-23979, UN DERIVE DE L'IMIDAZOLE

J. VAN GESTEL et J. VAN REEMPTS

Fruits, mars 1980, vol. 35, n° 3, p. 165-170.

RESUME - L'observation macroscopique et la microscopie électronique à balayage de la pourriture de fruits, de la croissance mycélienne et de la formation des spores, ont été utilisées pour évaluer l'efficacité du fongicide 1 [2 - (2,4-dichlorophenyl) - 2 (2-propényloxy) ethyl] - 1 H - imidazole (R-23979) sur des oranges artificiellement infectées par *Penicillium italicum*. Le champignon ne s'est pas développé durant la période d'observation de six jours, sur les fruits qui avaient été plongés dans un sulfate de R-23979 à 0,01 p. 100 un jour après l'inoculation. Pour les fruits traités trois jours après l'inoculation, une réduction nette de l'infection fongique était notée, en même temps que l'absence de formation de conidies. La déformation des hyphes et l'absence du développement de conidies ont été mises en évidence par la microscopie électronique à balayage.

Les agrumes sont exposés à une série d'agents de pourriture, surtout après la cueillette, durant le transport et dans les commerces de détail. La moisissure bleue de contact provoquée par *Penicillium italicum* WEHMER figure parmi ces pourritures fruitières fort répandues. Elle se présente sur le fruit comme une moisissure glauque entourée d'une zone aqueuse.

R-23979, 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-propényloxy)ethyl]-1H-imidazole, est un nouveau fongicide systémique mis au point par les Laboratoires de Recherche de Janssen Pharmaceutica, Belgique (2). R-23979 appartient à la classe des imidazoles à substitution N, qui comprend le miconazole, agent antifongique largement utilisé en médecine (6).

La recherche présente avait pour but d'étudier la morphologie de *P. italicum* sur des oranges artificiellement infectées. Des oranges non traitées, ainsi que des oranges traitées au sulfate de R-23979 (* R-27180), ont été examinées par évaluation macroscopique des lésions et par microscopie électronique à balayage.

* Laboratoires de Phytopharmacie et de Biologie cellulaire, Janssen Pharmaceutica, Laboratoires de Recherche, B-2340 Beerse, Belgique.

La source originale de cet article est le *Plant Disease Reporter*, avril 1979, vol. 63, n° 4, qui nous a aimablement autorisés à la reproduction.

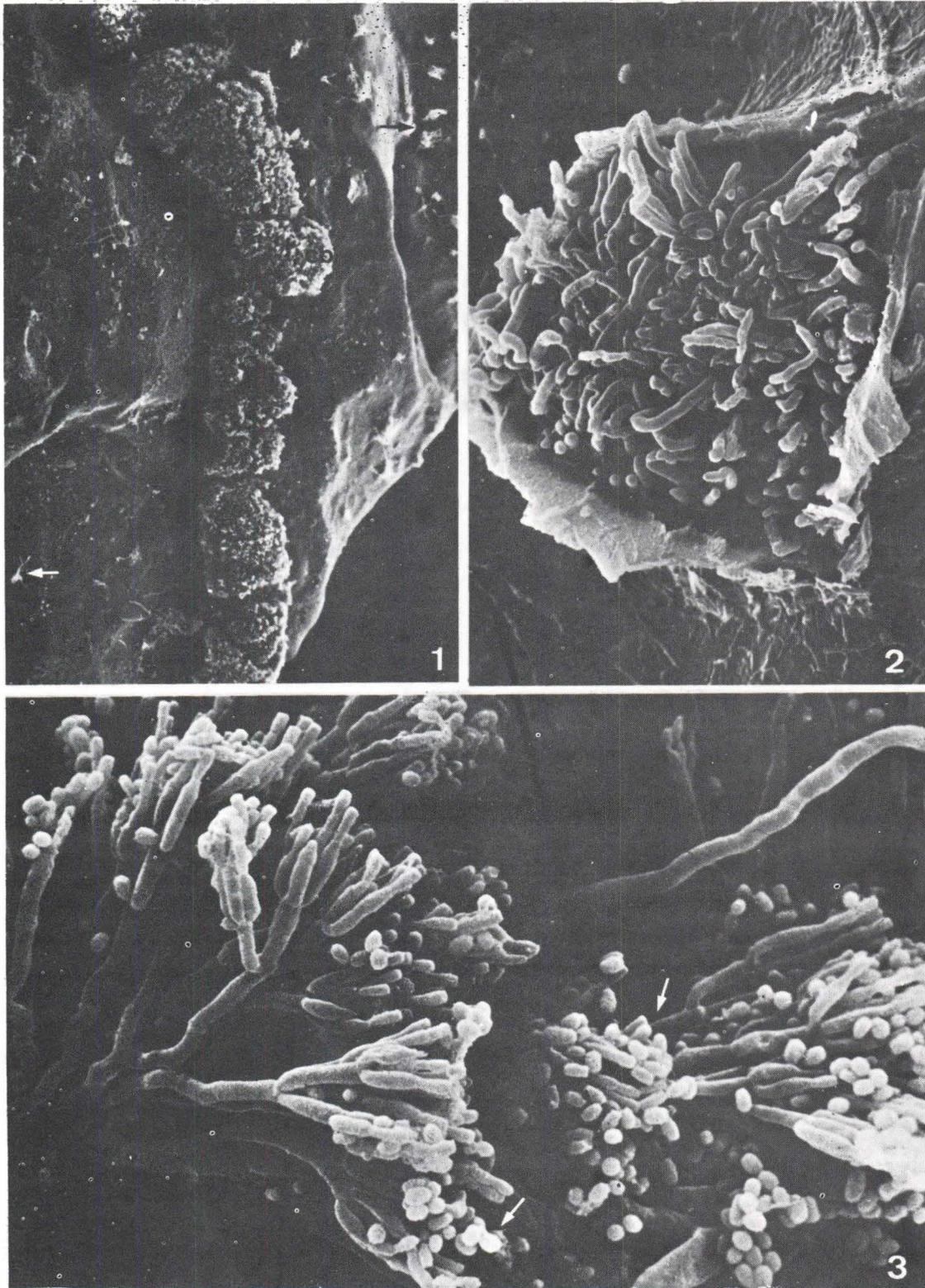


Figure 1. Orange non traitée - 4e jour p.i. On constate un développement mycélien dans la plaie faite par le perce-bou-
chon (c b) et en certains endroits de la peau (flèche).

Figure 2. Orange non traitée - 4e jour p.i. L'épiderme est soulevé et pénétré par une masse d'hyphes.

Figure 3. Orange non traitée - 6e jour p.i. Structure typique biverticillée du penicillium, présentant une production de
conidies (flèches).

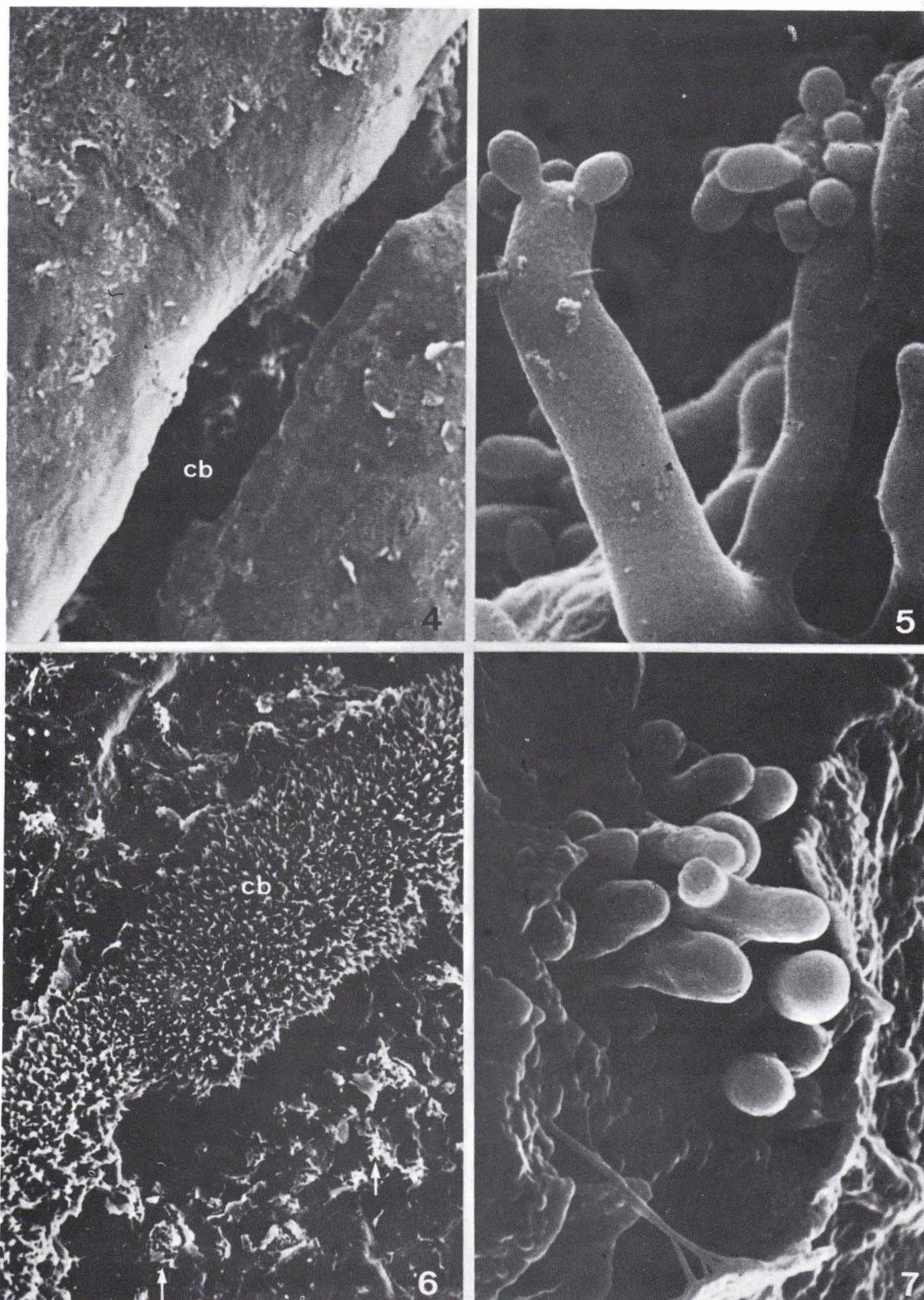


Figure 4. Orange traitée 24 h après l'inoculation - 4e jour p.i. On ne constate pas de croissance fongique ni dans la plaie (c b), ni sur la surface.

Figure 5. Orange traitée 24 h après l'inoculation - 6e jour p.i. Plaie infectée. On note un développement totalement anormal des hyphes. Pas de structure de penicillium mais le gonflement et la ramification inhabituels sont frappants.

Figure 6. Orange traitée 72 h après inoculation - 6e jour p.i. L'inhibition de la croissance est constatée dans la plaie (c b) et sur les masses saillantes des hyphes (flèches).

Figure 7. Orange traitée 72 h après inoculation - 6e jour p.i. Détail d'une masse d'hyphes gonflée, pénétrant dans la peau. A ce stade du traitement, la formation de conidies est totalement supprimée.

MATERIEL ET METHODE

Hôte : *Citrus sinensis* ou Washington navel, fruits mûrs non traités, importés d'Espagne.

Inoculation : *Penicillium italicum*, CBS 339.48, a été cultivé sur gélose de glucose et de pommes de terre (PDA, Difco). L'inoculum était préparé en grattant les conidies sur la surface d'une culture de quinze jours. Les conidies ont été mises en suspension dans 10 ml d'eau stérile distillée, dans un homogénéisateur Potter-Elvehjem, à la concentration de 10^8 conidies par ml.

L'inoculation a été réalisée en blessant le fruit à l'aide d'un perce-bouchon stérile de 11 mm de diamètre. Le perce-bouchon était trempé dans l'inoculum avant chaque blessure, puis enfoncé dans la peau du fruit à une profondeur d'environ 2 mm. Chaque orange était inoculée en trois endroits.

Un perce-bouchon stérile uniquement trempé dans de l'eau a été utilisé pour blesser les oranges servant de témoins non inoculés. Au cours de l'expérience, les fruits ont été placés dans un incubateur à $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, humidité relative 100 p. 100.

Traitement fongicide : un jour (expérience 1) ou trois jours (expérience 2) après l'inoculation, les fruits ont été plongés pendant une minute dans une solution aqueuse à 0,01 p. 100 de R.27180.

Dans chaque expérience, neuf oranges étaient traitées et neuf oranges étaient plongées dans de l'eau seule.

Evaluation et prélèvements : l'évaluation de l'efficacité du R.27180 et les prélèvements pour la microscopie électronique à balayage ont été réalisés quatre, cinq ou six jours après l'inoculation. A chacun de ces intervalles, trois oranges traitées et trois oranges non traitées étaient évaluées sur le plan de la pourriture ; le diamètre de la zone pourrie de la peau était mesuré visuellement ; le développement du champignon sur la surface du fruit était estimé.

Préparation pour le SEM (microscopie électronique à balayage) : des échantillons de $0,5 - 1 \text{ cm}^2$ ont été prélevés dans les zones inoculées. La fixation sous vide s'est faite en solution de formaldéhyde-glutaraldéhyde de Karnovsky, dans un tampon de 0,1 M phosphate (pH 7,4) de Sørensen, pendant quatre heures à température ambiante. Après un séjour d'une nuit dans le même tampon, les échantillons ont été post-fixés sous vide dans 1 p. 100 d' OsO_4 dans un tampon de 0,05 M véronal-acétate (pH 7,4), pendant une heure à température ambiante. Après un bref rinçage dans le tampon de véronal-acétate, les échantillons ont été déshydratés dans une suite graduée d'éthanol et d'éthanol-acétone jusqu'à 100 p. 100 d'acétone. Ils ont été séchés par la méthode du point critique, recouverte par pulvérisation d'une couche d'or de 40 nm, puis examinés dans le SEM Philips 500 au voltage d'accélération de 25 kV.

RESULTATS

Evaluation macroscopique des lésions.

Avant l'inoculation, les oranges étaient macroscopiquement exemptes d'infection fongique. Après l'inoculation artificielle, toutes les oranges non traitées présentaient un pourrissement uniforme et progressif au niveau de chaque blessure (tableau 1). La croissance mycélienne est devenue visible le quatrième jour après l'inoculation (p.i. : post-inoculation), sur le pourtour des blessures. Le cinquième jour p.i., la moitié de la surface de la zone pourrie était couverte de mycélium et la formation de conidies commençait. Le sixième jour p.i., cette formation de conidies était abondante.

Dans l'expérience 1, où le traitement fongicide était appliqué 24 h p.i., un fruit sur neuf présentait un pourrissement : une lésion le quatrième jour p.i. et une deuxième lésion le cinquième jour p.i. : par contre, aucune croissance mycélienne n'était observée.

Dans l'expérience 2, la pourriture de la peau était déjà installée et irréversible lorsque les fruits ont été traités le troisième jour p.i. Il a cependant été possible de stabiliser la pourriture et la croissance mycélienne sur ces fruits traités au fongicide. La formation de conidies, abondante sur les témoins, n'a pas été observée pour les oranges traitées au R.27180 (tableau 1).

Microscopie électronique à balayage.

a) oranges non infectées et non traitées. Les fruits n'ont montré aucune altération spécifique au terme de quatre jours.

b) oranges infectées non traitées. Le développement fongique a commencé au niveau du site infecté (figure 1) et s'est propagé dans toute la zone de façon tant centripète que centrifuge. Les ramifications asymétriques de *P. italicum* (3) avec les conidiophores et les phialides étaient visibles après le 4e jour p.i. A ce moment commençait également la formation des conidies. En divers endroits, l'épiderme était nettement brisé à partir de l'intérieur, par des masses d'hyphes. Ces masses étaient cependant toujours exemptes de penicilli pleinement développés (figure 2). Les cinquième et sixième jours p.i., la croissance fongique devenait fort abondante dans la blessure et sur la surface, avec une production intense de conidies (figure 3).

c) oranges infectées et traitées au R.27180.

● Traitement 24 heures après inoculation : du point de vue macroscopique, toutes les oranges étaient exemptes de croissance mycélienne ; mais après traitement, de petits foyers d'infection étaient encore visibles au SEM au fond des blessures, surtout les cinquième et sixième jours p.i. (figures 4 et 5). Les hyphes étaient extrêmement gonflées, anormalement ramifiées sans formation de penicillium (figure 5). Très peu de masses d'hyphes saillaient de la peau.

TABLEAU 1 - Effets macroscopiques des lésions de la peau d'oranges infectées par *Penicillium italicum* et traitées par R.27180.

Jours après inoculation	Pas de traitement			R.27180 (0,01 p. 100)					
				Traitement 24 h après inoculation			Traitement 72 h après inoculation		
	Nombre lésions par inoculation	Dimension (mm) moyenne \pm S.D.	Résultat (a)	Nombre lésions par inoculation	Dimension (mm) moyenne \pm S.D.	Résultat (a)	Nombre lésions par inoculation	Dimension (mm) moyenne \pm S.D.	Résultat (a)
3	27/27	25,1 \pm 6,7	A	0/27	0	0	27/27	25,1 \pm 3,4	A
4	54/54	37,0 \pm 8,1	B	1/27	16	A	27/27	31,2 \pm 4,5***	A
5	36/36	48,7 \pm 10,6	C	2/18	29 et 23	A	18/18	39,9 \pm 6,7***	B
6	18/18	63,6 \pm 10,0	D	0/9	0	0	9/9	53,8 \pm 5,9**	B

^aA : pas de mycélium sur la peau pourrissante

B : croissance mycélienne

C : croissance mycélienne et sporulation

D : formation extensive de spores

0 : pas de lésions

Probabilité : Student's t-test *** \leq 0,001 ** \leq 0,01

Certaines parties de la surface présentaient régulièrement un développement limité des tubes germinatifs et des hyphes probablement issus de conidies venant de l'inoculum. Les cinquième et sixième jours p.i., ces structures avaient toutes une configuration et une dimension anormales et présentaient de nombreuses cicatrices de division, réparties au hasard sur la paroi cellulaire. En outre, des structures séparées de type phialide présentaient des anomalies de division similaires.

● Traitement 72 heures après inoculation : très caractéristique était l'observation selon laquelle la formation de conidies était totalement supprimée à tous les stades, après traitement (figures 6 et 7). La croissance normale des hyphes était arrêtée et des configurations fongiques anormales apparaissaient aussi bien dans les blessures qu'en surface.

DISCUSSION

L'effet antisporel de R.27180 (2) dans une expérience curative est particulièrement important dans le cas de *P. italicum*, étant donné que ce champignon peut infecter par contact, sans que la peau du fruit ne soit nécessairement blessée. La concentration de R.27180 n'était que de 0,01 p. 100. Malgré cela, la substance a presque totalement empêché

la croissance fongique lorsqu'elle était appliquée 24 heures après l'inoculation. Les tubes germinatifs et les hyphes étaient gonflés, il y avait une distorsion complète de la ramification habituelle. Puisqu'aucune pourriture n'a été notée, on peut présumer que les hyphes dans la plaie - lorsqu'il y en avait - avaient perdu leur capacité de se développer dans les tissus voisins et de soulever l'épiderme. Appliqué trois jours après l'inoculation, R.27180 inhibait le taux de pourriture de façon significative. La croissance fongique existante était également altérée du point de vue morphologique. Les hyphes et les penicilli se déformaient, leur dimension et leur forme changeaient nettement. La formation de conidies était totalement inhibée. Toutes ces altérations impliquent des changements physiologiques drastiques du champignon qui affectent ses capacités d'infection et de multiplication.

Les observations coïncident bien avec celles faites lors d'une étude *in vitro* sur les conidies de *P. italicum* traité par R.23978 (4). Un taux de germination réduit, un gonflement des conidies et une distorsion des tubes germinatifs étaient notés. On a suggéré que l'action du R.23979 comprendrait l'inhibition des fonctions de la membrane cellulaire (5 et 6), ressemblant aux altérations morphologiques et biochimiques de la membrane décrites après le traitement de *Candida albicans* au miconazole (1 et 7).

Les auteurs expriment leur reconnaissance pour les conseils précieux reçus du Dr M. BORGERS et du Dr THIENPONT dans la préparation du manuscrit.

Ils remercient également l'«Instituut tot Aanmoediging van het Wetenschappelijk Onderzoek in Nijverheid en Landbouw» pour son appui financier.

BIBLIOGRAPHIE

1. De NOLLIN S. et BORGERS (M.). 1975.
Scanning electron microscopy of *Candida albicans* after *in vitro* treatment with miconazole.
Antimicrob. Agents Chemother., 7, 704-711.
2. LAVILLE (E.Y.), HARDING (P.R.), DAGAN (Y.), RAHAT (M.), KRAGHT (A.J.) and RIPPON (E.L.). 1977.
Studies on imazalil as potential treatment for control of Citrus fruit decay.
Proc. Int. Soc. Citriculture, 1, 269-273.
3. RAPER (K.B.) and THOM (C.). 1949.
A manual of the penicillia. pp. 41-59 and 523-531.
Williams and Wilkins Co, Baltimore, 875 p.
4. SIEGEL (M.R.), KERKENAAR (A.) and KAARS SIJPESTEIJN (A.). 1977.
Antifungal activity of the systemic fungicide imazalil.
Neth. J. Plant Pathol., 83 (suppl. 1), 121-133.
5. SIEGEL (M.R.) and RAGSDALE (N.N.).
Antifungal mode of action of imazalil.
Pest. Biochem. Physiol., (in press).
6. VAN CUTSEM (J.M.) and THIENPONT (D.). 1972.
Miconazole, a broad-spectrum antimycotic agent with antibacterial activity.
Chemotherapy (Basel), 17, 392-404.
7. VAN DEN BOSSCHE (H.). 1974.
Biochemical effects of miconazole on fungi.
1.- Effects on the uptake and/or utilization of purines, pyrimidines, nucleosides, amino acids and glucose by *Candida albicans*.
Biochem. Pharmacol., 23, 887-899.
8. VAN TUYL (J.M.). 1977.
Genetic aspects of resistance to imazalil in *Aspergillus nidulans*.
Neth. J. Plant Pathol., 83 (suppl. 1), 169-176.

