



HAL
open science

Effets de deux modes de conservation sur la viabilité et la toxinogénèse de souches d'*Aspergillus fumigatus*.

Résultats préliminaires

Hamid Boudra, Diego Morgavi, David Alvarez, Brigitte Michalet - Doreau

► **To cite this version:**

Hamid Boudra, Diego Morgavi, David Alvarez, Brigitte Michalet - Doreau. Effets de deux modes de conservation sur la viabilité et la toxinogénèse de souches d'*Aspergillus fumigatus*. Résultats préliminaires. Journées du réseau de mycologie, Jan 2003, Nancy, France. 1 p., 2003. hal-02827493

HAL Id: hal-02827493

<https://hal.inrae.fr/hal-02827493>

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Effets de deux modes de conservation sur la viabilité et la toxinogénèse de souches d'*Aspergillus fumigatus*. Résultats préliminaires.

H. BOUDRA, D-P. MORGAVI, D. ALVAREZ, B. MICHALET-DOREAU.

INRA, Centre Clermont-Theix, Unité de Recherche sur les Herbivores, 63122 Saint Genès-Champanelle, France

INTRODUCTION

Plusieurs méthodes de conservation des souches de moisissures ont été proposées (1). Certaines d'entre elles présentent des risques de contamination et de mutations génétiques, notamment une réduction ou la perte du pouvoir toxinogène après plusieurs années de conservation. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'effet du cryoprotecteur utilisé et du mode de conservation sur la viabilité des spores d'*A. fumigatus* et de leur pouvoir toxinogène.

METHODES

1. MODES DE CONSERVATION

Un essai préliminaire a été réalisé avec une souche toxinogène d'*A. fumigatus* (Afu 09), et a permis de comparer trois cryoprotecteurs (glycérol à 10% (G), lait entier à 10% (L) et le mélange Inositol 5%-Lait 10% (M), et deux modes de conservation (lyophilisation et cryoconservation).

1. Modes de conservation

Les spores de culture (3j, 37°C) ont été mis stérilement en suspension d'abord dans du Tween 20 à 0.05%, puis avec 2 ml de la solution de cryoprotecteur préalablement stérilisée. Chaque essai a été réalisé en duplicate.

1.1. Cryoconservation (Cr)

- Les cryotubes contenant la suspension de spores dans le cryoprotecteur ont été mis à +4°C toute une nuit.
- ils ont été ensuite placés dans un Bicell® qui permet de diminuer progressivement la température de 0.5°C par minute jusqu'à la température désirée de -80°C.
- Les échantillons cryogénés ont été soit décongelés au Bain Marie à 37°C (Cr-BM) soit Lyophilisés (Cr-Lyo).

1.2. Lyophilisation (Ly)

Les échantillons ont été congelés à -20°C, puis lyophilisés pendant 24h.

2. CRITERES D'EVALUATION

Des essais de viabilité et de toxinogénèse, avant et après 2 mois de conservation, ont été effectués sur chaque cryoprotecteur et mode de conservation testés.

2.1. Dénombrement et Vitesse de croissance

Le dénombrement des unités formant colonies (UFC) et la mesure du diamètre des colonies ont été effectués après 2 j d'incubation à 35°C sur milieu solide Malt 2%.

2.2. Toxinogénèse

Les essais ont été réalisés sur milieu de culture mis au point au laboratoire (2) : Minimum Eagle Medium additionné de 5% de sérum fœtal de bovin et de saccharose à 30 g.L⁻¹. La gliotoxine a été dosée après 6j d'incubation par Chromatographie Liquide Haute Performance.

RESULTATS

Pour les cryoprotecteurs lait et mélange Inositol-Lait, le taux moyen de survie était significativement plus élevé après cryoconservation ($\pm 50\%$ vs $<15\%$), et ceci sans modification significative de la vitesse de croissance. Cependant, l'utilisation de glycérol semble avoir un effet important sur la viabilité des spores après cryoconservation (tableau 1). Les mêmes remarques sont valables pour la toxinogénèse, puisque la gliotoxine a été détectée dans tous les échantillons à l'exception de ceux lyophilisés et cryoconservés avec le glycérol.

Tableau 1: Viabilité et toxinogénèse en fonction du mode de conservation

	Viabilité (48 h) ^(a)				Toxinogénèse (6 j)	
	10 ² CFU/ml ^(b) (%)		Croissance (mm)		Gliotoxine ^(a)	
	Avant	Après	Avant	Après	Avant	Après
Cr-BM-Lait	27	13 (48)	1.8	1.6	+	+
Cr-Lyo-Lait	27	13 (48)	1.8	1.7	+	+
Cr-BM-Mélange	39	20 (51)	1.8	1.6	+	+
Cr-Lyo-Mélange	39	22 (56)	1.8	1.5	+	+
Cr-BM-Glycérol	13	10 (77)	2	1.5	+	-
Cr-Lyo-Glycérol	13	0 (0)	2	0	+	-
Ly-Lait	27	1 (4)	1.8	1.6	+	-
Ly-Mélange	39	5 (13)	1.8	1.5	+	-

(a) : valeur moyenne de 2 analyses

(b) : Taux de survie (%)

En conclusion, ces essais préliminaires montrent que la congélation à -80°C apparaît comme une bonne méthode de conservation des moisissures. Il convient cependant de vérifier ces résultats sur l'ensemble des souches à notre disposition.

1- Smith, D. et Kolowski, J. 1996. *In Preservation and maintenance of cultures in biotechnology and industry*. A. Belt et J. Hinter-Cevera (eds). Pp: 101-132.

2- Boudra, H., et al. 2002. 9^{ème} Rencontres Recherches Ruminants