



HAL
open science

Lutte contre les fusarioses des épis de blés : quantification des espèces du complexe fusarien, facteurs de risque et méthodes de lutte

Emmanuelle Gourdain, Hélène Batina, Philippe Du Cheyron, Arnaud Fourrey,
Sandrine Gelisse, Guénolé Grignon, Valerie Laval, Claude Maumené, Benoît
Méléard, Romain Valade

► To cite this version:

Emmanuelle Gourdain, Hélène Batina, Philippe Du Cheyron, Arnaud Fourrey, Sandrine Gelisse, et al.. Lutte contre les fusarioses des épis de blés : quantification des espèces du complexe fusarien, facteurs de risque et méthodes de lutte. Innovations Agronomiques, 2016, 49, pp.133-145. 10.15454/1.4622769356130952E12 . hal-01652932

HAL Id: hal-01652932

<https://hal.science/hal-01652932v1>

Submitted on 30 Nov 2017

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

Lutte contre les fusarioses des épis de blés : quantification des espèces du complexe fusarien, facteurs de risque et méthodes de lutte

Gourdain E.¹, Batina H.², Du Cheyron P.³, Fourrey A.¹, Gélisse S.², Grignon G.¹, Laval V.², Maumené C.¹, Méléard B.¹, Valade R.⁴

¹ ARVALIS-Institut du végétal, Station expérimentale 91720 Boigneville

² UR 1290 BIOGER – CPP INRA-AgroParisTech

³ ARVALIS-Institut du végétal, route de Châteaufort - RD 36 - ZA des Graviers 91190 Villiers le Bâcle

⁴ ARVALIS-Institut du végétal, Laboratoire de pathologie végétale, avenue Lucien Brétignières BP 01 78 850 Thiverval-Grignon

Correspondance : e.gourdain@arvalisinstitutduvegetal.fr

Résumé

La fusariose de l'épi est une maladie du blé induite par un complexe de plusieurs espèces de champignons des genres *Fusarium* et *Microdochium*, ayant des caractères épidémiologiques différents, productrices ou non de toxines. Le fait que ces espèces ne présentent pas la même sensibilité intrinsèque aux fongicides, et que certaines aient sélectionné des résistances peut limiter l'efficacité actuelle de ces méthodes de lutte. La réduction programmée de l'usage des produits phytosanitaires associée à l'apparition de ces résistances a conduit ARVALIS-Institut du végétal associé aux unités Bioger et MycSA de l'INRA à proposer un projet de recherche dans le cadre de l'appel à projet Recherche finalisée et innovation des instituts techniques agricoles, soutenu par le CASDAR. L'objectif de ce projet, baptisé EcoFusa, visait, par la mise à disposition des outils moléculaires de quantification des principales espèces *Fusarium* et *Microdochium*, à mieux comprendre les interactions entre blé, pathogènes et toxines à travers leurs modulations par les pratiques agronomiques et le climat. Trois grands axes ont été développés (i) la quantification des principales espèces fongiques du complexe fusarien présentes sur le territoire français en relation avec les pratiques agricoles et le climat; (ii) l'évaluation de pratiques alternatives aux fongicides; (iii) l'optimisation des traitements fongicides.

Mots-clés : fusariose des épis, biologie moléculaire, mycotoxines, lutte alternative

Abstract: Controlling *Fusarium* head blight on wheat: quantification of the species of the complex fusarium, risk factors and control methods

Fusarium head blight is a cereal disease caused by a complex of several fungi species (*Fusarium* and *Microdochium*), with different epidemiological characteristics, producing or not toxins. The fact that these species do not have the same intrinsic sensitivity to fungicides, and some have selected resistance may limit the effectiveness of current control methods. The reduction in pesticide use associated with the occurrence of these resistances led ARVALIS-Institut du végétal associated with INRA, units BIOGER and MycSA to propose a research project within the call for proposals oriented research and innovation of agricultural technical institutes, supported by CASDAR. The objective of this project, named EcoFusa, was, through the use of molecular tools for quantification of *Fusarium* and *Microdochium* key species, to better understand interactions between wheat, pathogens and toxins through their modulation by agronomic practices and weather. Three major themes were developed (i) quantification of the main fungus species of the *Fusarium* complex on the main French agricultural area in relation to agricultural practices and weather; (ii) evaluation of practical alternatives to fungicides; (iii) optimization of conventional treatment.

Keywords: *Fusarium* head blight, molecular biology, mycotoxins, alternative control

La fusariose de l'épi est une maladie du blé induite par un complexe d'espèces présentes en fréquence variable sur les grains pouvant causer, certaines années, des pertes importantes de rendement. En effet, la nuisibilité moyenne associée aux attaques de « fusarioses » a été estimée en moyenne à 15 q/ha en région Centre entre 2007 et 2009. Ainsi, les années « dites à fusarioses » peuvent engendrer des pertes économiques conséquentes pour un agriculteur, d'autant plus que le traitement fongicide, dans des conditions optimales d'application, n'a que 75% d'efficacité. Associée à cette perte économique directe pour l'agriculteur, il existe un enjeu sanitaire de taille puisque certaines espèces du complexe fusarien sont susceptibles de produire des mycotoxines dans les grains et ainsi dégrader la qualité sanitaire. Or, depuis le 1^{er} juillet 2006, les filières blé tendre et blé dur sont soumises au règlement européen 1881/2006 qui fixe des limites maximales en déoxynivalenol (DON) de 1750 et 1250 µg/kg pour les lots de blé dur et de blé tendre non transformés destinés à l'alimentation humaine. Ainsi, le respect des limites réglementaires est devenu une nouvelle condition d'accès au marché et les répercussions économiques peuvent être considérables en cas de reclassement vers d'autres débouchés des lots non conformes.

La lutte contre cette maladie est rendue particulièrement difficile en raison de la diversité des espèces pathogènes qui en sont responsables et qui possèdent des caractéristiques épidémiologiques différentes. Ainsi, deux genres fongiques sont principalement impliqués dans la fusariose du blé tendre comme du blé dur en Europe : *Microdochium*, avec deux espèces majoritaires *M. nivale* et *M. majus* (Glynn et al., 2005) et *Fusarium*. Au sein du genre *Fusarium*, les espèces prédominantes en Europe sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum* et *F. poae* (Bottalico et Perrone, 2002 ; Iqbal et al., 2004). Si les souches du genre *Microdochium* sont non toxigènes, les deux principales espèces de *Fusarium* susceptibles de produire des trichothécènes B dont le DON sont *F. graminearum* et *F. culmorum*.

Depuis la mise en place de cette réglementation, 2 à 3 millions d'ha de blés ont reçu chaque année une protection contre la fusariose de l'épi dans des contextes climatiques qui parfois ne le justifiaient pas *a posteriori*. Cependant, les critères objectifs de prise de décision restent encore fragmentaires, en particulier concernant la lutte contre *Microdochium*. Or, dans un contexte de réduction programmée de l'utilisation des produits phytopharmaceutiques dictée par le plan Ecophyto, il est établi que le traitement de l'épi participe largement à la pression d'utilisation des fongicides sur blés. Considérant que cet objectif s'accompagne de la nécessité du maintien d'une agriculture productive qui satisfasse les débouchés alimentaires, les enjeux économiques et sanitaires de la lutte contre les « fusarioses » deviennent cruciaux. Le rapport Ecophyto R et D piloté par l'INRA (Butault et al., 2010) suggère qu'une première étape de réduction de -20 ou -30% peut être atteinte sur la base des systèmes de production actuels, moyennant un meilleur raisonnement des pratiques phytosanitaires. Les fongicides ont un fort pouvoir structurant sur les populations de *Fusarium* et *Microdochium* observées sur le grain et peuvent déplacer les équilibres de flore dans un sens favorable ou défavorable à la qualité sanitaire. Un choix approprié des matières actives actuelles accompagné d'un positionnement judicieux des applications permis par la prise en compte des différentes espèces fongiques présentes sur les épis d'une parcelle permettraient ainsi de limiter les applications inutiles et d'éviter de favoriser les espèces toxigènes. Ces applications doivent également tenir compte de l'émergence de nouvelles populations résistantes aux différentes familles de fongicides (Walker et al., 2009). Avec des débouchés exclusivement en alimentation humaine et des variétés utilisées sensibles à très sensibles à la fusariose, l'enjeu sur blé dur est d'autant plus important que le traitement anti-fusariose est aujourd'hui quasi-systématique pour assurer des blés de bonne qualité sanitaire. Dans ce cas, le développement de biofongicides pourrait s'avérer une solution alternative incontournable.

Plusieurs pistes sont donc envisageables pour répondre à l'objectif de réduction des fongicides allant du raisonnement des applications aux méthodes de lutte alternative mais doivent s'appuyer sur le développement de méthodes d'analyse innovantes. Pour cela, la quantification par voie moléculaire (Q-PCR) peut permettre de définir de façon plus objective, les critères qui concourent à l'estimation des risques *Fusarium* et *Microdochium* et conduire à des conseils mieux ciblés.

Concernant les moyens de lutte alternative, de nombreuses études ont mis en évidence l'impact des pratiques culturales et des facteurs environnementaux sur la production de DON et donc indirectement sur

le développement de *F. graminearum*. Les facteurs qui ressortent systématiquement sont le climat autour de la floraison, le précédent cultural, le travail du sol ainsi que la sensibilité variétale (Obst et Bechtel, 2000 ; Schaafsma et al., 2001 ; Barrier-Guillot et al., 2006 ; Lemmens, 2007 ; Gourdain et al., 2009). Néanmoins, l'impact de ces facteurs sur l'équilibre de la flore fusarienne de l'épi n'a jamais été décrit. Parmi ces facteurs, la présence dans le sol de résidus de la récolte précédente est décrite comme déterminante, les *Fusarium* et *Microdochium* étant capables de survie saprophyte. Cette aptitude est particulièrement marquée chez *F. graminearum* (Wilcoxson et al., 1988 ; Naef et Defago, 2006). Les populations ainsi conservées constituent la source majeure d'inoculum primaire susceptible d'infecter la culture suivante (Luongo et al., 2005 ; Bateman et al., 2007 ; Caron et al., 2007). Or, les pratiques culturales actuelles en France tendent de plus en plus à limiter le labour et donc favorisent la persistance de ces niches refuges pour l'inoculum primaire. La gestion des résidus de culture devient donc une composante particulièrement importante à intégrer dans la démarche visant à réduire les risques d'infection (Musa et al., 2007). Un second facteur d'importance est le choix variétal (Obst et Bechtel, 2000 ; Schaafsma et al., 2001 ; Koch et al., 2006). Il existe chez les variétés de blé tendre et de blé dur une importante variabilité pour leur sensibilité aux différentes espèces du complexe fusarien. Ces classements sont aujourd'hui stabilisés par rapport à *Fusarium graminearum* mais les éléments concernant les deux espèces de *Microdochium* sont inexistantes.

A travers des enquêtes auprès des agriculteurs initiées depuis 2001, ARVALIS-Institut du végétal a établi des grilles de diagnostic agronomique du risque DON destinées aux agriculteurs pour adapter leur traitement fongicide au contexte agronomique et climatique. Néanmoins, les analyses réalisées sur ces enquêtes ne prennent pas en compte les espèces fongiques présentes, et les préconisations en terme de traitements fongicides sont exclusivement orientées sur les espèces fongiques productrices de DON. Plus largement, les outils de gestion du risque déclinés sous forme de modèles de prévision des teneurs en DON (Schaafsma et al., 2001 ; Barrier-Guillot et al., 2006 ; Van der Fels-Klerx et al., 2008 ; Gourdain et al., 2009) demeurent très perfectibles, notamment en intégrant des données épidémiologiques.

Ainsi, afin de mieux comprendre les interactions entre plantes / pathogènes / toxines à travers leurs modulations par les pratiques agronomiques et le climat, ARVALIS-Institut du végétal en partenariat avec les unités INRA BIOGER et MycSA ont mené à terme un projet de recherche, le projet EcoFusa : lutte contre les fusarioses des épis de blés : de l'utilisation raisonnée des fongicides aux méthodes de lutte alternative, soutenu financièrement par le CASDAR. Les principales avancées scientifiques attendues par le projet étaient (i) la mise à disposition et l'utilisation d'un panel d'outils moléculaires optimisés pour la détection et la quantification des principales espèces de *Fusarium* et *Microdochium*, et de leurs résistances aux fongicides ; (ii) une description quantitative de la microflore fusarienne des grains de blés en France ; (iii) une analyse de l'impact des facteurs agronomiques (gestion des résidus, rotation, variété, fongicide, biomolécules anti-fongiques) sur l'équilibre de ces espèces sur les cultures de blés.

Cet article fait le point sur les principaux résultats obtenus, aussi bien sur les méthodes analytiques développées que sur les avancées scientifiques concernant l'épidémiologie des espèces fongiques. Les résultats concernant la lutte agronomique ainsi que l'optimisation de la lutte chimique et l'utilisation de biomolécules ne seront pas abordés, ayant fait l'objet de publications détaillées par ailleurs (Gourdain et al., 2015 ; Batina et al. 2015).

1. Quantification et répartition des principales espèces fongiques du complexe fusarien présentes sur le territoire français en relation avec les pratiques agricoles et le climat

1.1 Matériel et Méthodes

Afin d'étudier la répartition des principales espèces du complexe fusarien (*M. majus*, *M. nivale*, *F. graminearum* et *F. culmorum*) à partir d'échantillons collectés dans des parcelles d'agriculteurs dans les

grands bassins de production français, ces quatre tests devaient au préalable être finalisés et validés. Dès 2011, deux tests PCR en temps réel (Q-PCR) pour la détection et la quantification de *F. graminearum* et *F. culmorum* existaient au sein de l'UMR BIOGER (financé partiellement par ANR DON&Co, Bayer CropScience et ARVALIS). Ces tests étaient en cours de recherche pour leur fiabilité dans la quantification des deux espèces. De même, des tests de Q-PCR basés sur le gène de la β -tubuline étaient en cours de développement pour les deux espèces *Microdochium majus* et *M. nivale*. Ces outils ont été développés en technologie Taqman®. L'évaluation des méthodes Q-PCR développées a été réalisée par le calcul de critères de performance tels que la spécificité des tests pour détecter uniquement l'espèce concernée, l'efficacité de la réaction PCR, la linéarité des tests, la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ). Les protocoles ainsi établis ont été fournis aux différents partenaires. Sur les trois ans du projet, 876 échantillons de farine ont été extraits, dosés pour dilution, quantifiés par PCR en temps réel pour les quatre espèces fongiques *F. graminearum*, *F. culmorum*, *M. majus* et *M. nivale* (Tableau 1). La dilution est également dosée par un système de PCR en temps réel qui quantifie l'ADN de plante (Nicolaisen et al., 2009). Ainsi, les données obtenues sont exprimées en pg d'ADN de champignon par ng d'ADN de plante. En complément et dans un souci de validation de la méthode utilisée, 190 échantillons ont été sélectionnés pour une analyse de flore sur boîte de Pétri, afin d'évaluer les différences entre une approche microbiologique et une approche moléculaire. Pour chaque échantillon, un sous-échantillon de 200g de grains a été confié à un laboratoire sous-traitant qui a réalisé les analyses de microbiologie sur 100 grains.

Tableau 1 : Nombre d'échantillons analysés en Q-PCR par année et par espèce de blé

	Echantillons blé tendre	Echantillons blé dur	Total échantillons
Année 2011	230	83	313
Année 2012	184	93	277
Année 2013	199	87	286

Pour mettre en place le dispositif d'enquêtes auprès des agriculteurs, ARVALIS a utilisé son implantation dans les grandes régions productrices de blé tendre et de blé dur afin de solliciter les coopératives agricoles ou les agriculteurs directement. Pour chaque parcelle, un kit de prélèvement est envoyé à l'agriculteur. Ce kit comprend un document rappelant les consignes pour le prélèvement de grains à la récolte de telle sorte que celui-ci soit représentatif. A réception, l'échantillon est nettoyé, homogénéisé, broyé et divisé en sous-échantillons qui sont envoyés aux différents laboratoires d'analyse, BIOGER pour la quantification des quatre espèces par Q-PCR et un laboratoire sous-traitant pour le dosage des teneurs en DON par méthode chromatographique (LC-MSMS). En 2013, ARVALIS s'est appuyé sur son partenariat avec FranceAgriMer pour la collecte des échantillons. Sur l'ensemble de la durée du projet, 446 échantillons blé dur et blé tendre confondus ont été collectés.

L'ensemble des données renseignées dans les questionnaires accompagnant les échantillons, les données de quantification de la flore fusarienne, les teneurs en DON et les données climatiques ont été compilés pour être traitées statistiquement avec le logiciel R. Une première phase d'analyse des données a été réalisée par des études de corrélation entre variables (espèces fongiques entre elles, espèces fongiques et toxines, etc.).

1.2 Résultats

Les quatre tests de détection et de quantification (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *M. nivale* et *M. majus*) ont été validés. Ils sont caractérisés par une efficacité supérieure à 90%, une linéarité (r^2) supérieure à 0.99, une LOD de 5.10^{-4} ng d'ADN de champignon / ADN de plante et une LOQ de 5.10^{-3} ng. La comparaison entre méthodes microbiologique et moléculaire montre qu'il existe une bonne corrélation linéaire (Pearson) entre Q-PCR et analyse de flore pour l'espèce *F. graminearum* ($r=0.77$) après

transformation logarithmique pour les teneurs en ADN. Pour *Microdochium*, la corrélation passe par la somme des valeurs obtenues en Q-PCR, car la microbiologie ne permet pas de distinguer les deux espèces, et est égale à $r=0.65$. Le résultat plus faible sur *Microdochium* peut s'expliquer par un biais de la méthode d'analyse microbiologique qui est réalisée dans les conditions optimales pour la détection et le dénombrement des souches des espèces du genre *Fusarium* (25°C) et défavoriserait donc les champignons du genre *Microdochium* sensibles aux températures supérieures à 18°C. L'étude graphique (Figure 1) montre que les relations entre Q-PCR et microbiologie ne semblent néanmoins pas tout à fait linéaires, deux modèles non linéaires, modèle monomoléculaire largement utilisé pour décrire les phénomènes biologiques et les réactions chimiques (bleue), ont été ajustés pour chacune des deux espèces ($R^2 = 0.77$). Avec cette relation, on peut conclure qu'une méthode est substituable à l'autre.

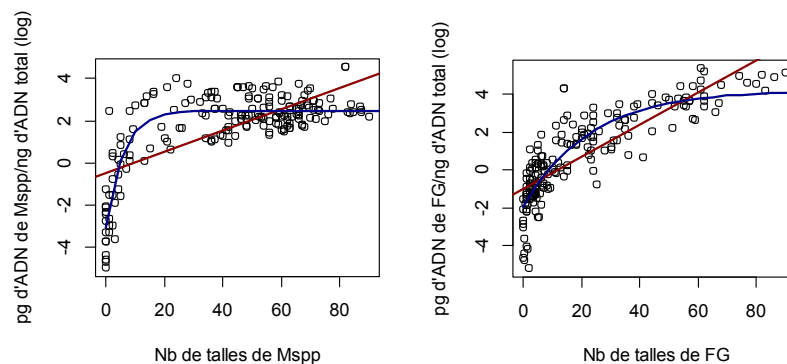


Figure 1 : Relations entre méthodes Q-PCR et microbiologie pour *F. graminearum* et *M.spp*

Pour étudier la distribution spatiale des espèces fongiques, des cartes ont été produites et ont permis de constater un effet régional marqué sur la distribution des espèces (Figure 2).

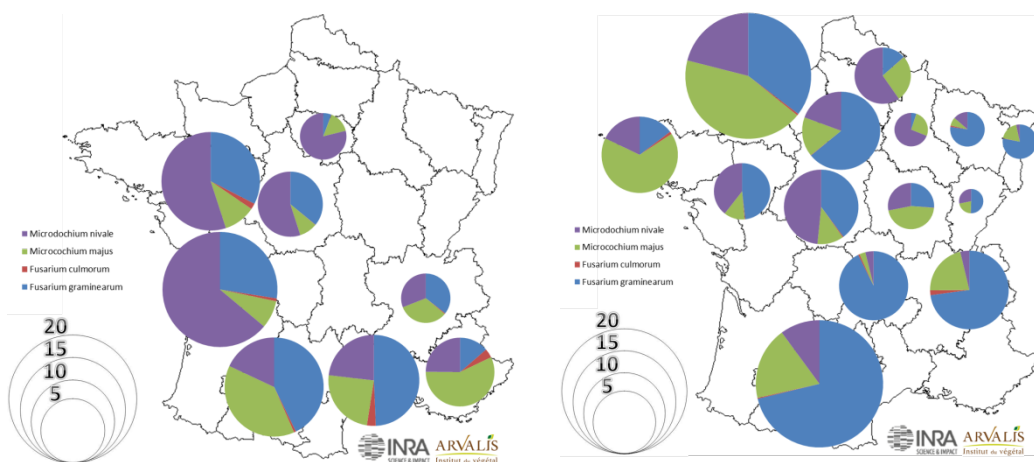


Figure 2 : Répartition des quatre espèces fongiques quantifiées par Q-PCR (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *M. nivale* et *M. majus*) sur les échantillons de blé dur (à gauche) et blé tendre (à droite) collectés en 2012.

A l'échelle du territoire, *F. graminearum* a été quantifié dans 82% des échantillons de blé dur comme de blé tendre mais avec une disparité annuelle importante (84% en 2011, 69% en 2012 et 93% en 2013) et des teneurs pouvant aller jusqu'à 32 pg d'ADN/ng. 72% des échantillons présentent *M. majus* dont 96% en 2013 (maximum à 14 pg/ng). Les résultats pour *M. nivale* sont très similaires, il est quantifié dans 67% des échantillons dont 92% en 2013 mais avec des niveaux moyens plus faibles atteignant au maximum 10 pg/ng. Enfin, concernant *F. culmorum*, les résultats démontrent sa faible occurrence au

sein du complexe fusarien, avec un taux de détection de 19% et des niveaux très faibles de quantification proche de 0.01 pg/ng.

Concernant les corrélations entre teneurs en DON et quantifications de *F. graminearum* (Q-PCR), elles varient entre années de 0.6 à 0.9, avec les coefficients les plus faibles en 2011, année avec peu d'échantillons et où les niveaux moyens en DON sont très faibles (< 100µg/kg) ainsi que les quantifications d'ADN (proche de 0.1 pg/ng). Ce résultat confirme que *F. graminearum* est le principal producteur de DON (Tableau 2).

Tableau 2 : Coefficients de corrélation (Pearson) entre espèces productrices de DON et teneurs en DON et entre les quatre espèces fongiques. Résultats obtenus sur les données pluriannuelles (2011 à 2013).

Corrélation	Blé dur		Blé tendre	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
F.g. / DON	0.87	< 0.001	0.81	< 0.001
F.c. / DON	0.17	0.03	0.14	0.08
F.g. / M.m.	0.49	< 0.001	0.52	< 0.001
F.g. / M.n.	0.67	< 0.001	0.49	< 0.001
M.m. / M.n.	0.77	< 0.001	0.84	< 0.001

Par ailleurs, il existe une très bonne corrélation entre les deux espèces de *Microdochium* et ce indépendamment de l'année et l'espèce de blé considérée. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude tendent à confirmer que *Fusarium graminearum*, *Microdochium majus* et *Microdochium nivale* sont capables de cohabiter à l'échelle de la parcelle de blé sans apparition de phénomènes compétitifs. En effet, les valeurs des coefficients de corrélation entre les trois espèces dominant le complexe sont positives et supérieures à 0.5, traduisant ainsi le fait qu'il n'y ait pas d'exclusion d'une espèce par une autre.

En complément de ces analyses de corrélation, la réalisation d'un test du Khi² ($p = 0.55$) permet d'insister sur l'absence d'exclusion d'une des espèces du complexe fusarien par le type de blé hôte (Figure 3).

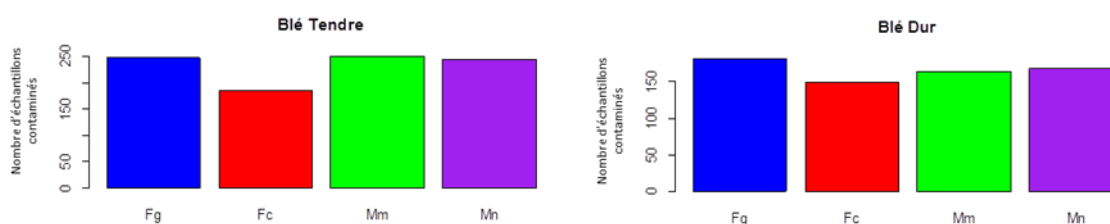


Figure 3 : Occurrence des quatre principales espèces du complexe fusarien en fonction de l'espèce hôte.

2. Identification des facteurs de risque et étude des méthodes de lutte alternatives aux fongicides

2.1 Matériel et Méthodes

Afin de hiérarchiser les facteurs agro-climatiques impactant les espèces du complexe fusarien, une première approche par Random Forest (Breiman, 2001) a été mise en œuvre à l'aide du logiciel R. Le modèle a d'abord été travaillé avec l'ensemble des variables agronomiques et climatiques suspectées

d'impacter (autant positivement que négativement) la présence des quatre principales espèces du complexe fusarien. Puis, seules les variables ayant le plus de poids ont été retenues. Pour compléter cette analyse, une approche par ajustement de modèles linéaires mixtes avec l'effet année en aléatoire a permis de déterminer les pratiques agronomiques et facteurs pédoclimatiques ayant une incidence significative sur la quantité de champignon présent (ADN) dans les échantillons de grains collectés au champ. Cette même méthode a été utilisée pour valider la grille d'évaluation du risque DON.

Parmi les facteurs de risque identifiés, la lutte agronomique via la gestion des résidus ainsi que la lutte génétique par le choix variétal ont été étudiées dans des essais analytiques. La partie lutte agronomique a fait l'objet d'une publication scientifique dans Gourdain et al. (2015) et ne sera donc pas détaillé dans cet article. Les conclusions principales sont que les résidus en surface constituent la source majeure d'inoculum pour *F. graminearum*, inoculum significativement moduler par la qualité et la quantité de résidus ; pour *M. nivale* et *M. majus*, les résultats des quantifications moléculaires nous ont permis de comprendre que ces deux espèces ne sont pas impactées par les pratiques agronomiques et que l'origine de leur inoculum reste inconnue à ce jour. Concernant la lutte génétique, l'étude s'appuie sur un réseau d'essais ARVALIS pour la caractérisation des variétés quant à leur résistance à l'accumulation en DON. Ces essais mettent en œuvre des dispositifs en conditions favorisantes, cannes de maïs épandues au sol et blés brumisés pendant toute la période des floraisons. Sur l'ensemble des essais conduits entre 2011 et 2013, 127 échantillons de blé tendre de 30 variétés ont été analysés. Le choix des variétés a été orienté sur les variétés témoins (pérennes dans le temps) complété par les variétés dont le potentiel de développement est important. Les échantillons ont suivi le processus classique de réception, nettoyage et broyage. Un sous-échantillon de broyat a ensuite été envoyé aux différents laboratoires sous-traitants ainsi qu'au laboratoire de Pathologie Végétale d'ARVALIS pour une quantification des quatre espèces concernées par Q-PCR : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *M. majus* et *M. nivale*. L'ensemble des résultats obtenus a été compilé dans une base de données et l'analyse statistique des données, avec le logiciel R, a été réalisée en ajustant des modèles linéaires (classiques ou mixtes). La validation de la méthodologie d'évaluation des variétés quant à leur résistance à l'accumulation en DON nécessite de s'assurer que la proportion moyenne de *Microdochium spp.* sur un essai par rapport à *F. graminearum* (dénommée « typologie ») ne bouleverse pas le classement variétal établi sur la base de la sensibilité à l'accumulation en DON établi sur un autre essai possédant une typologie différente.

Pour compléter le dispositif au champ, un essai a été réalisé la dernière année du projet sous serre. Deux variétés de blé tendre ont été choisies pour leur sensibilité différentielle à l'accumulation de DON. Les variétés sont semées, puis dix épis de chaque variété sont inoculés à la floraison selon quatre modalités : *F. graminearum* seul, *M. majus* seul, *F. graminearum* en mélange avec *M. majus* (*F. graminearum*, 5.10^{-3} spores /ml et *M. majus*, 5.10^{-5} spores / ml), ainsi que de l'eau pour le témoin négatif. Les épis sont ensachés pendant quatre jours pour favoriser l'infection, des notations de sévérités, des analyses Q-PCR et de DON ont été réalisées à la fin de l'essai. Pour des raisons de coût et du faible grammage des échantillons, les analyses de Q-PCR et DON n'ont pu être répétées, limitant le traitement statistique.

2.2 Résultats

L'étude des facteurs de risque par random forest montre que pour les quatre espèces du complexe fusarien, année et région sont les facteurs de rang 1, suivis de variables agro-climatiques (évapotranspiration et somme des pluies autour de la floraison, somme des températures depuis le semis), enfin seul un facteur agronomique ressort parmi les cinq premières variables de l'analyse pour *F. graminearum*, le type de précédent cultural. Le pourcentage de variance expliquée par le modèle varie de 3% pour *F. culmorum*, 48% pour *F. graminearum* et *M. nivale*, à 61% pour *M. majus*. L'étude par modèle mixte montre que concernant *Fusarium graminearum*, précédent cultural, travail du sol, ETP et région sont hautement significatifs ($p < 10^{-5}$), suivis de l'espèce cultivée (blé tendre ou blé dur) et du cumul des précipitations autour de la floraison ($p < 10^{-2}$). Pour *F. culmorum*, seules la région et l'espèce

cultivée interviennent significativement sur le niveau d'ADN quantifié. Pour *M. majus*, espèce cultivée, ETP et broyage des résidus jouent de manière très significative sur le niveau de contamination (ADN), suivis de la région et de la durée du cycle. Pour *M. nivale*, espèce cultivée, température et région sont significatives dans l'analyse, les températures basses favorisant la prolifération du champignon.

La grille de risque agronomique (Figure 4), mise au point par ARVALIS en 2011, permet d'évaluer le risque de voir le taux de DON dans le grain dépasser la limite maximale réglementaire de 1250 µg/kg en blé tendre en se basant sur des critères agronomiques (gestion des résidus et sensibilité variétale) et climatiques (cumul de précipitation à floraison \pm 7 jours), et ainsi de conseiller l'application d'un traitement phytosanitaire afin de maîtriser ce risque. Cet outil, élaboré initialement à partir de l'étude des teneurs en DON, a pu être éprouvé vis-à-vis de la présence de *F. graminearum* grâce aux données acquises. Les résultats obtenus ont confirmé la validité de la grille vis-à-vis (i) des teneurs en DON et (ii) des quantités d'ADN fongique mesurées. Bien qu'il n'existe pas de différence statistique systématique entre les différentes classes de risque, celles présentant le risque le plus élevé se trouvent également être celles contenant le plus de DON et d'ADN de *F. graminearum*.

Gestion des résidus*	Sensibilité variétale	Risque	Pluie (mm) autour de la floraison (+/- 7 jours)			
			<10	10-40	>40	
Céréales à paille, colza, lin, pois, féverole, tournesol	Labour ou résidus enfouis	1				
	Techniques sans labour ou résidus en surface	2				
		3			T	
		3			T	
	Betteraves, pomme de terre, soja, autres	Labour ou résidus enfouis	2			
		Techniques sans labour ou résidus en surface	3			T
2						
4				T	T	
Maïs et sorgho fourrages		Labour ou résidus enfouis	2			
		Techniques sans labour ou résidus en surface	4		T	T
	5			T	T	
	6		T	T	T	
	Maïs et sorgho grains	Labour ou résidus enfouis	2			
		Techniques sans labour ou résidus en surface	3		T	T
4				T	T	
6			T	T	T	

ARVALIS-Institut du végétal 2011

Figure 4 : Grille d'évaluation du risque d'accumulation du déoxynivalénol (DON) dans le grain de blé tendre et d'aide au traitement contre la fusariose sur épi

Concernant les essais analytiques sur les variétés, l'analyse statistique effectuée sur une liste variétale de blé tendre réduite n'a pas permis de mettre en évidence d'interaction statistiquement significative entre la variété et la typologie (équilibre entre *Microdochium* et *F. graminearum*) (Tableau 3). Néanmoins, cette analyse ne porte que sur une liste réduite de variétés et d'autres données sont nécessaires afin de confirmer ce résultat.

Tableau 3 : Test des différents effets du modèle sur blé tendre

Effet testé	p-value test F	Significativité
interaction variété : typologie	0.23	Non
précocité	0.33	Non
typologie	0.99	Non
variété	1.04e-14	Oui

Lors d'une co-inoculation de *F. graminearum* et *M. majus*, les quantités d'ADN de ces deux espèces sont quantifiées dans des proportions similaires à celles observées dans le cadre des inoculations seules (Figure 5). Il en va de même pour le DON, dont les teneurs dosées sont semblables entre une inoculation avec *F. graminearum* seule et en co-inoculation avec *M. majus*. En l'absence de répétition, il semble difficile de conclure sur la modulation de l'équilibre de flore par la variété mais il apparaît, à travers cet essai, que quelle que soit la sensibilité variétale, le développement de *F. graminearum* n'est pas affecté par la présence *M. majus*. Cet essai mériterait d'être reproduit en introduisant des répétitions afin de pouvoir conclure.

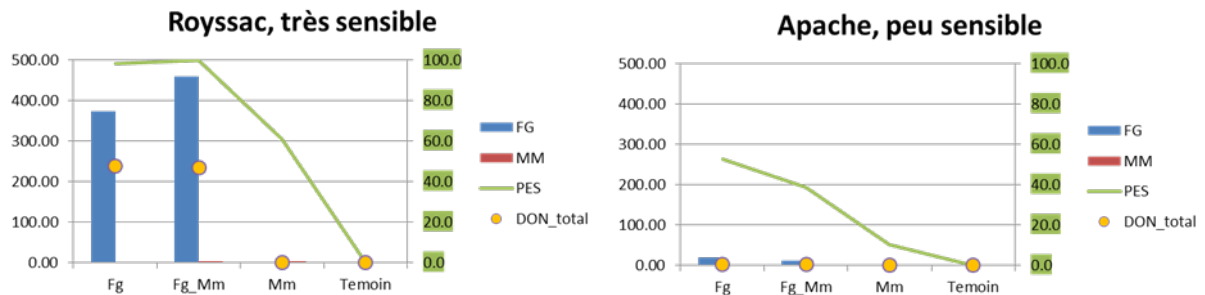


Figure 5 : Comparaison de la réponse de deux variétés de blé tendre face à une inoculation de *F. graminearum* seul, *M. majus* seul et en co-inoculation. Quantités d'ADN (pg d'ADN fongique / ng d'ADN de plante), DON ($\mu\text{g} / \text{kg}$), et % d'épillets symptomatiques à 21 jours (PES).

3. Utilisation des pièges à spores au champ pour piloter le traitement anti-fusariose

3.1. Matériel et Méthodes

En préalable, une mise au point des méthodes d'extraction de l'ADN des pièges à spores et de l'utilisation des méthodes de quantification de *F. graminearum* validées a été nécessaire (Bryone et al., 2012). L'étude des vols d'ascospores de *F. graminearum* nécessite de travailler sur des pièges à spores disposés au cœur des parcelles de blé de telle sorte que les buses de captage soient positionnées au même niveau que les épis de blé. Deux pièges ont été disposés dans des parcelles de blé en précédent maïs, avec et sans labour, suivis sur les campagnes 2011, 2012 et 2013 sur la station expérimentale de Boigneville (91). Un piège surmonté de cannes de maïs préalablement inoculées a également été positionné en 2012 et 2013 à proximité des parcelles comme témoin positif. Les captures ont été réalisées entre mai et juin de chaque année. Tous les sept jours, les bandes ont été remplacées et stockées avant analyse. Les données climatiques associées aux périodes de piégeage ont été également enregistrées.

3.2. Résultats

L'analyse des bandes du témoin positif a révélé la présence de pics d'ADN de *F. graminearum* permettant de valider que les conditions climatiques ont été favorables à l'éjection des spores. La comparaison entre modalités labour et non labour n'a été réalisée que sur les données 2014 pour lesquelles les pics de quantification d'ADN étaient les plus forts. La comparaison a mis en évidence des quantifications dans le piège positionné sur la parcelle labourée quatre fois moins fortes que dans la parcelle en non labour, validant l'effet du travail du sol sur la pression de l'inoculum. Le coefficient de corrélation faible de 0.14 montre que les pics mesurés ne se produisent pas les mêmes jours et donc que le travail du sol joue en intensité sur l'inoculum mais aussi sur sa distribution temporelle. La suite de l'analyse statistique a porté sur le piège positionné en maïs non labour et une analyse statistique pluriannuelle a été entreprise afin d'étudier la relation entre le climat et les événements de piégeage. L'étude par cross-corrélation (spécifique aux analyses de séries temporelles) n'a pas permis de mettre en évidence de corrélation forte entre pluie, température ou humidité relative et quantité d'ADN de *F. graminearum* (Figure 6).

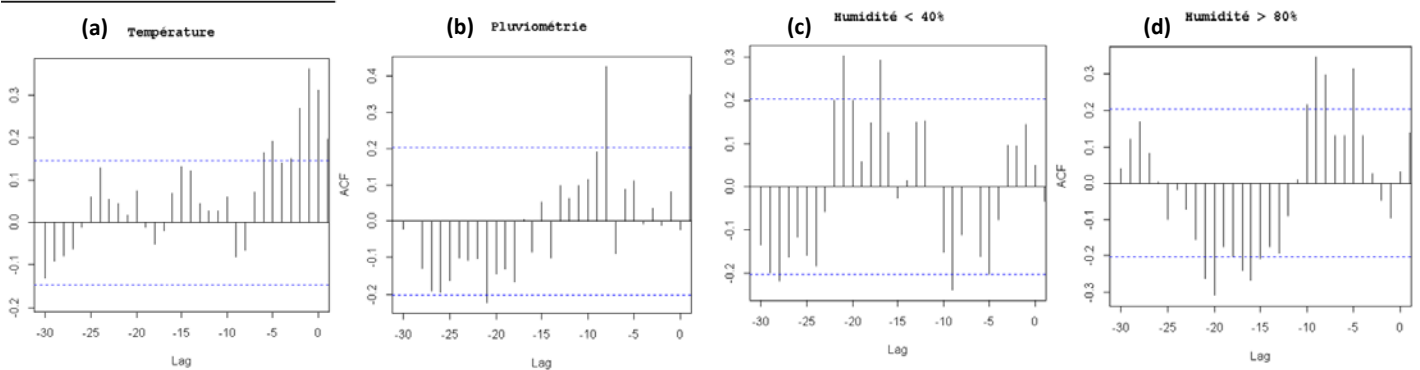


Figure 6 : Correlogrammes de la quantité d'ADN de *F.graminearum* en fonction des différentes variables climatiques en 2012 et 2014. (a) moyenne des températures journalières, (b) cumul des précipitations journalières, (c) cumul du nombre d'heures d'humidité inférieure à 40% et (d) cumul du nombre d'heures avec une humidité supérieure à 80%.

Ce résultat peut s'expliquer facilement par une forte variabilité entre les trois années étudiées mais également par le fait que la cross-corrélation ne permet pas d'étudier les facteurs climatiques en interactions. Pour cela, une analyse par random forest a été réalisée mais les résultats n'ont pas été plus concluants. Les analyses sur *Microdochium* doivent encore être réalisées.

4. Discussion

A l'issue du projet de recherche, des méthodes de quantification des ADN de *F. culmorum*, *F. graminearum*, *M. nivale* et *M. majus* dans des farines de blé tendre comme de blé dur, dans des résidus de culture ainsi que sur des bandes de pièges à spores ont été développées, de même que des tests de quantification des résistances aux principales familles de fongicides. Ces méthodes ont été validées selon les critères classiques de performance et transférées entre les trois laboratoires avec des écarts entre résultats inférieurs à 5%. Ces mises au point, indispensables à la réussite du projet, ont permis d'analyser plus de 1000 échantillons de grains, résidus ou bandes sur les trois ans de durée du projet. Elles constituent une avancée majeure dans l'étude de cette maladie, qui en plus de l'impact économique causé par la perte de rendement, peut avoir un impact sanitaire sur les productions de blé, et donc sur la santé des consommateurs. On peut néanmoins reprocher à cette méthode qu'elle ne permet pas d'accéder à la part de champignon vivant puisqu'elle passe par une mesure de l'ADN. Cependant, la relation obtenue entre cette nouvelle méthode et la méthode microbiologique permet de nous rassurer sur ce point et de mettre en évidence que les deux méthodes sont substituables l'une à l'autre.

Concernant les résultats sur la répartition des quatre espèces dans le temps et l'espace, l'étude a montré que *F. graminearum* était l'espèce dominante du complexe suivie par *M. majus* puis *M. nivale*. *F. culmorum* est très peu quantifié sur les trois années du projet ce qui confirme sa quasi-disparition sur les blés cultivés en France. Ce résultat est conforme aux résultats publiés par Xu et al. (2005). La forte corrélation ($r > 0.75$) entre teneur en DON et quantification d'ADN de *F. graminearum* a été confirmée aussi bien dans les échantillons de grains des enquêtes agriculteurs que dans l'ensemble des essais où la composition de la flore était variable. Ce résultat confirme le statut de *F. graminearum* de principal producteur de DON sur le territoire français. Cette corrélation nous conduit à penser que la production de DON constitue un facteur chimique nécessaire à la propagation de ce champignon sur son hôte conformément aux conclusions de Gosman et al. (2010). Cette production ne semble pas modulée par la présence d'autres champignons puisque de nombreux échantillons analysés étaient infectés par deux ou trois espèces incluant *F. graminearum* et *Microdochium spp.* en quantité variable. Les analyses statistiques sur les quantifications ont démontré que les trois espèces fongiques pouvaient co-exister sur une même parcelle sans phénomène de compétition et plus particulièrement d'exclusion, résultat conforme aux travaux de Pettitt et al. (2003). Le projet a aussi mis en évidence une très bonne

corrélation entre les deux espèces de *Microdochium* et ce indépendamment de l'année et l'espèce de blé considérée, résultat jamais démontré à ce jour.

Par ailleurs, les résultats montrent une disparité annuelle et régionale importante de l'occurrence des quatre espèces fongiques. Les analyses statistiques mettent en évidence l'importance du climat mais aussi des conditions pédo-climatiques régionales et par conséquent des pratiques agronomiques sur la variabilité des quantifications d'ADN. Ce constat est d'autant plus marqué pour *F. graminearum* puisque c'est la seule espèce pour laquelle des variables agronomiques sont ressorties des analyses de Random Forest et du modèle linéaire mixte. Ces éléments confirment que l'inoculum de *F. graminearum* est très fortement inféodé à la parcelle et à son historique. En effet, les résultats du projet publié par Gourdain et al. (2015) confirment que le type de résidu et sa quantité modulent significativement la quantité d'inoculum présent sur les résidus. En terme de lutte alternative, une gestion fine des résidus de culture est donc fortement conseillée dans la lutte contre *F. graminearum*, tout comme le choix d'une variété peu sensible à l'accumulation de DON. Sur ce point, les analyses statistiques réalisées sur le réseau d'essais de caractérisation des sensibilités variétales ne permettent pas de prouver la présence d'une interaction entre la variété et la typologie de l'essai (répartition des différentes espèces fongiques en présence). Cette démonstration confirme ainsi la pertinence de la méthode d'évaluation variétale actuellement utilisée. Les conditions biologiques théoriques nécessaires à l'expression de cette interaction sont : (i) une compétition entre *F. graminearum* et *Microdochium spp.* défavorisant l'installation de *F. graminearum* et donc la production de DON associée et (ii) une sensibilité différenciée à *Microdochium spp.* des variétés cultivées. Or, les résultats obtenus sur les enquêtes au champ ainsi que d'autres essais menés par ARVALIS montrent que cette compétition n'existe pas au champ et que, *in vitro*, cette compétition est à l'avantage de *F. graminearum* (Gourdain et al., 2013).

Concernant les deux espèces de *Microdochium*, les études statistiques montrent que les deux espèces ont un comportement proche même si les résultats du projet publiés dans Gourdain et al. (2015) n'ont pas permis d'apporter de réponse quant à l'origine de l'inoculum. Il semblerait que la quantité d'inoculum soit peu impactée par les pratiques agronomiques mais quasi exclusivement dépendante des conditions climatiques. La voie de lutte la plus prometteuse pourrait être le choix variétal sous réserve qu'un classement de sensibilité puisse être établi, cette évaluation est actuellement travaillée dans le cadre d'un projet de recherche financé par le Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale (FSOV). En attendant, la lutte chimique reste le moyen actuel le plus efficace pour contrôler la maladie malgré la confirmation de la présence de populations résistantes aux benzimidazoles et strobilurines (Batina et al., 2015).

Les méthodes de lutte proposées actuellement ne prennent souvent en compte qu'une espèce fongique, or c'est bien par la prise en compte de la proportion entre les espèces présentes durant la culture du blé, et le cas échéant leur statut de résistance, que les méthodes de lutte doivent s'orienter. Par la mise au point de méthode d'analyse des bandes de piège à spores, le projet doit permettre des avancées majeures dans les années à venir sur la compréhension de l'épidémiologie des différentes espèces par l'analyse des vols de spores en lien avec les épisodes climatiques et ainsi par une meilleure compréhension des équilibres de flore dans les parcelles. Ces études, couplées à l'évaluation variétale, doivent permettre de proposer *in fine* des outils de pilotage du risque global « fusariose » à travers notamment des modèles de prévision.

Remerciements

Merci à la Direction Générale de l'Enseignement et la Recherche ainsi qu'à FranceAgriMer pour leurs contributions financières à ces travaux.

Références bibliographiques

- Barrier-Guillot B., Delambre M., Morel A., Maumené C., Gouet H., Grosjean F., Leuillet M., 2006. Identification of agronomic factors that influence the level of DON in wheat grown in France. Mycotoxins and phycotoxins. In H. Njapau, S. Trujillo, H.P. van Egmond, D.L. Park (Eds.) Advances in determination, toxicology and exposure management, 239-247
- Bateman G.L., Gutteridge R.J., Gherbawy Y., Thomsett M.A., Nicholson P. 2007. Infection of stem bases and grains of winter wheat by *Fusarium culmorum* and *F-graminearum* and effects of tillage method and maize-stalk residues. Plant Pathology 56, 604-615.
- Batina H., Atanasova-Penichon V., Fourrey A., Gelisse S., Grignon G., Laval V., Maumené C., Méléard B., Valade R., Walker A.S., Gourdain E., 2015. Utilisation raisonnée des fongicides et apport des biofongicides pour lutter contre la fusariose des épis de blés. 5^e Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives de protection des plantes, Lille, 11 au 13 mars 2015.
- Bottalico A., Perrone G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology 108 (7), 611-624.
- Boutigny A.L., Richard-Forget F., Barreau C., 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. Review. European Journal of Plant Pathology 121, 411-423.
- Breiman L., 2001. Random Forests. Machine Learning 45(1), 5-32.
- Bryone F., Batina H., Laval V., Leclère A., Toussaint-Ferreyrolle J., 2012. Du piégeage à la quantification de spores de *Fusarium graminearum* : étude préliminaire. 10^e Conférence Internationale sur les MALadies des plantes, Tours, 3 au 5 décembre 2012.
- Butault J.P., Dedryver C.A., Gary G., Guichard L., Jacquet F., Meynard J.M., Nicot P., Pitrat M., Reau R., Sauphanor B., 2010. Écophyto R&D : Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides?
- Caron D., Malavergne D., Dupont de Dinechin L., 2007. Impact of agro-environmental factors on the *F. graminearum* inoculum level and kinetics of ascospores release. In: Colloque scientifique RARE Arcachon, France, pp. 11-12.
- Doohan F.M., Brennan J., Cooke B.M., 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. European Journal of plant pathology 109, 755-768.
- EC Commission Regulation 2006. Commission Regulation n°1881/2006 of 19 december 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union 20.12.2006 L364/5-L364-24.
- Glynn N.C., Hare M.C., Parry D.W., Edwards S.G., 2005. Phylogenetic analysis of EF-1 alpha gene sequences from isolates of *Microdochium nivale* leads to elevation of varieties majus and nivale to species status. Mycological Research 109, 872-880
- Gosman N., Srinivasachary, Steed A., Chandler E., Thomsett M., Nicholson P., 2010. Evaluation of type I *Fusarium* head blight resistance of wheat using non-deoxynivalenol-producing fungi. Plant Pathology 59(1), 147-157.
- Gourdain E., Lannou, C., 2013. Fusariose des épis, Le degré d'infection fonction de l'équilibre entre deux champignons. Perspectives agricoles, 399.
- Gourdain E., Piraux F., Barrier-Guillot B., 2009. Les outils pour gérer le risque déoxynivalénol sur blé tendre et blé dur. AFPP – 9^{ème} Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 8 et 9 décembre 2009.
- Gourdain E., Maumené C., Valade R., Labreuche J., 2015. Lutte prophylactique contre la fusariose des épis : état des connaissances acquises dans le cadre du projet CASDAR ECOFUSA. 5^e Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives de protection des plantes, Lille, 11 au 13 mars 2015.
- Ioos R., Belhadj A., Menez M., 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. Mycopathologia 158 (3), 351-362.
- Koch H.J., Pringas C., Maerlaender B., 2006. Evaluation of environmental and management effects on *Fusarium* head blight infection and deoxynivalenol concentration in the grain of winter wheat. European Journal of Agronomy 24, 357-366.

- Lemmens M., 2007. Genetical, ecophysiological and biochemical interactions modulating the biogenesis of *Fusarium* mycotoxins. In Colloque scientifique RARE, Arcachon, France, pp. 3-4.
- Luongo L., Galli M., Corazza L., Meeke E., De Haas L., Van der Plas C.L., Kohl J., 2005. Potential of fungal antagonists for biocontrol of *Fusarium* spp. in wheat and maize through competition in crop debris. *Biocontrol Science and Technology* 15, 229-242.
- Musa T., Hecker A., Vogelgsang S., Forrer H.R., 2007. Forecasting of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in winter wheat with FusaProg. *Bulletin OEPP* 37, 283-289.
- Munkvold G.P., 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of plant pathology* 109, 705-713.
- Naef A., Defago G., 2006. Population structure of plant-pathogenic *Fusarium* species in overwintered stalk residues from Bt-transformed and non-transformed maize crops. *European Journal of Plant Pathology* 116, 129-143.
- Nicolaisen M., Supronienė S., Kærsgaard Nielsena L., Lazzaro I., Spliida N.H., Fejer Justesen A., 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76 (3), 234–240.
- Obst A., Bechtel A., 2000. Conditions climatiques favorisant l'attaque des épis de blé par *Fusarium graminearum*. In Réunion Club Fusariose, Bayer agro.
- Pettitt T., Xu X., Parry D., 2003. Association of *Fusarium* species in the wheat stem rot complex. *European Journal of plant pathology* 109(7), 769-774.
- Schaafsma A.W., Tamburic-Ilinic L., Miller J.D., Hooker D.C., 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 23, 279-285.
- Van der Fels-Klerx H.J., Kandhai M.C., Booij C.J.H., 2008. A conceptual model for identification of emerging risks, applied to mycotoxins in wheat-based supply chains. *World Mycotoxin Journal* 1, (1) 13-22.
- Walker A.S., Auclair C., Gredt M., Leroux P., 2009. First occurrence of resistance to strobilurin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. *Pest Management Science* 65(8), 906-921.
- Wilcoxson R.D., Kommedahl T., Ozmon E.A., Windels C.E. 1988. Occurrence of *Fusarium* Species in Scabby Wheat from Minnesota and Their Pathogenicity to Wheat. *Phytopathology* 78, 586-589.
- Xu X.M., Parry D.W., Nicholson P., Thomsett M. A., Simpson D., Edwards S.G., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J.M., Moretti A., Tocco G., Mule G., Hornok L., Giczey G., Tatnell J., 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* 112 (2), 143-154.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)