

**AFPP – ONZIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 7 AU 9 DÉCEMBRE 2015**

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE QUANTIFICATION MOLÉCULAIRE SPÉCIFIQUE DE *CLAVICEPS PURPUREA* AGENT DE L'ERGOT DES CÉRÉALES : APPLICATIONS A L'ÉTUDE DE SA DISPERSION ET A L'ÉVALUATION DE SA TOXICITÉ

C. VITRY ⁽¹⁾; F. DAUTHIEUX⁽¹⁾; R. DUCERF⁽²⁾; B. ORLANDO⁽²⁾; A. LECLERE⁽²⁾;
C. MAUMENE⁽²⁾ ET R. VALADE⁽¹⁾

(1) ARVALIS Institut du Végétal – Laboratoire de Pathologie végétale
Domaine AgroParisTech, Avenue Lucien Brétignières, Bâtiment INRA Bioger_cpp, 78850 Thiverval-Grignon, France. Mél : r.valade@arvalisinstitutduvegetal.fr

(2) ARVALIS Institut du Végétal, Station Expérimentale, 91720 Boigneville, France

RÉSUMÉ

La recrudescence de l'ergot des céréales en France en fait de nouveau un enjeu sanitaire important en raison de la production d'alcaloïdes dans les sclérotés de *Claviceps purpurea*. Une méthode de quantification par PCR en temps réel spécifique du groupe G1 de *C. purpurea* (sous-espèce pathogène des céréales et graminées en France) a été mise au point afin d'offrir un outil innovant et performant pour aider à la gestion du risque associé à l'ergot. La méthode validée a été mise en œuvre afin d'étudier la dispersion de l'inoculum primaire et secondaire et de caractériser des lots de grains pour leur concentration en ergot vis-à-vis de leur teneur en alcaloïdes. Les insectes ont été identifiés comme des vecteurs potentiels de l'ergot et la méthode a permis de confirmer la faible capacité de dispersion de l'inoculum primaire par le vent. L'intérêt de la qPCR a également été démontré pour étudier l'occurrence de l'agent pathogène et mettre en relation sa biomasse avec le taux d'alcaloïdes présent.

Mots-clés : *Claviceps purpurea*, qPCR, dispersion, alcaloïdes.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE PCR METHOD SPECIFIC TO *CLAVICEPS PURPUREA*, ERGOT OF CEREALS: APPLICATIONS TO STUDY OF ITS DISPERSION AND EVALUATION OF ITS TOXICITY

The resurgence of ergot of cereals in France is an important health issue due to the production of alkaloids in the sclerotia of *Claviceps purpurea*. A method for quantifying G1 group of *C. purpurea* (pathogenic subspecies of cereals and grasses) by real-time PCR was developed to provide an innovative and powerful tool in order to manage the risk associated with the ergot. The validated method was used to study dispersion of primary and secondary inoculum and to characterize flours for their ergot concentration in relation with their alkaloid content. Insects were identified as potential vectors of ergot and the method confirmed the low dispersion capacity of primary inoculum by wind. The advantage of the qPCR was also demonstrated in order to study the occurrence of the pathogen and to link biomass with the alkaloid content.

Keywords: *Claviceps purpurea*, qPCR, dispersion, alkaloids.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, il est constaté une augmentation de la présence d'ergot dans les céréales françaises. Les sclérotés de *Claviceps purpurea* trouvés dans les récoltes posent des problèmes sanitaires en raison de leur teneur en alcaloïdes, toxiques pour l'homme et l'animal. *Claviceps purpurea* Tul., champignon phytopathogène de la classe des Ascomycètes est responsable de la maladie connue sous le nom de « l'ergot des céréales ». Les souches de l'espèce *C. purpurea* sont classées en trois groupes (G1 à G3) principalement en fonction des plantes hôtes et des habitats, mais seules les souches du groupe G1 affectent les céréales cultivées de nos régions (Pažoutová et Parbery, 1999 ; Pažoutová *et al.*, 2000). Cette maladie tire son nom du sclérote, forme de conservation du champignon, que l'on retrouve développé sur l'épi au détriment du grain. Il s'agit d'une masse mycélienne allongée, compacte, noirâtre et légèrement arquée ressemblant à un ergot de gallinacé. La toxicité du champignon due à la présence d'alcaloïdes a été mise en évidence en 1676 (Lee, 2009). Chez l'Homme et l'animal, ces alcaloïdes provoquent la vasoconstriction des vaisseaux sanguins qui engendrent, entre autre symptômes, des hallucinations et des gangrènes pouvant provoquer la mort. Par la suite, de nombreuses recherches sur le pouvoir toxigène de l'ergot ont révélées plusieurs toxines comme l'ergocryptine, l'ergotamine, l'ergosine et l'ergocristine. Ces alcaloïdes sont des métabolites secondaires de la famille des indoles produits uniquement par le sclérote. Avec leurs épimères, ils ont été très vite utilisés pour diverses applications pharmaceutiques dont l'un des dérivés le plus connu est le diéthylamide de l'acide lysergique (LSD).

Le cycle biologique de *C. purpurea* comporte deux phases distinctes : la phase sexuée et la phase asexuée. La première débute au printemps par le développement d'un ou plusieurs stromas périthéciaux à partir du sclérote. Au sein des têtes à périthèces, la germination des ascocarpes est à l'origine des ascospores (spores sexuées). La dispersion de ces spores concorde très souvent avec la période d'anthèse des graminées prairiales. L'ascospore libérée va contaminer l'ovaire empêchant sa fécondation et donc la formation du grain. Lors de cette phase asexuée, un mycélium filamenteux (*Sphacelia segetum*) se développe autour de l'ovaire. Puis les hyphes produisent en leurs extrémités des conidiophores contenant de nombreuses conidies hyalines, unicellulaires et uninucléées constituant l'inoculum secondaire. La plante hôte réagit en produisant un miellat (Tenberge, 1999). Cette substance, composée de sucres résultant de la conversion des constituants du phloème, d'acides aminés et d'éléments minéraux sert de solution nutritive au champignon (Rapilly, 1968 ; Hardy, 1988) et protège les conidies de la dessiccation. Lorsque la graminée mûrit, le mycélium sphacélien se transforme en un mycélium sclérotial compact formant progressivement le sclérote. Ce processus de différenciation morphologique provoqué par une adaptation aux conditions environnementales peu favorables (Pažoutová *et al.*, 1980) est accompagné de la production d'alcaloïdes. Enfin, les sclérotés matures tombent sur le sol et deviennent source d'inoculum primaire pour l'année suivante.

Le développement des méthodes de détection moléculaire a permis d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la recherche des champignons pathogènes dans différents types d'échantillons. Dans un premier temps, la technologie PCR a permis la détection rapide des agents pathogènes, puis le développement de la PCR en temps réel (qPCR) a permis de détecter et quantifier simultanément les agents pathogènes. Actuellement, aucune méthode de ce type n'a été développée pour *Claviceps purpurea* du groupe G1. L'objectif de cette étude a été de mettre au point une méthode de détection et de quantification de *C. purpurea* spécifique du groupe G1 par PCR en temps réel permettant ainsi d'affiner nos connaissances sur ce champignon, notamment pour caractériser les voies de dispersion (inoculum primaire et secondaire) et anticiper les risques sanitaires.

MATERIELS ET MÉTHODES

Enquêtes d'occurrences

En 2013, 171 parcelles agriculteurs ont été enquêtées (98 de blé, 40 de triticales, 23 de seigle, 6 d'orge et 4 d'avoine). Pour chaque parcelle, 3 kg de grains ont été récoltés puis analysés. L'ensemble des sclérotés présents dans chaque lot a été compté et pesé pour déterminer la teneur en ergot. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés et nettoyés pour retirer les impuretés (pailles, glumes etc...) puis divisés en lots de 1.5 kg de grain dans lesquels les sclérotés ont été réintroduits. Les échantillons ont été broyés puis les teneurs en alcaloïdes ont été mesurées et ensuite corrigées du facteur de concentration induit par l'échantillonnage. Les broyats ont été conservés à 4°C. Ils ont servi à étudier les corrélations entre la présence d'alcaloïdes, la présence de sclérotés et la biomasse fongique obtenue par qPCR.

Réalisation des essais dispersions

Les essais 2012 et 2013 ont été réalisés à Boigneville (Essonne, Ile de France) à la station expérimentale d'Arvalis – Institut du Végétal (Latitude : 48,33°N / Longitude : 2,38°E). Les essais semés avec une lignée de blé hybride (lignée QH 529, Saaten-Union) ont été placés dans une vallée à l'abri des vents dominants, dans un sol de type limon-argileux. Au centre de l'essai (Figure 1) une zone de contamination a été définie et des sclérotés d'ergots ont été semés quelques jours après le semis (fin octobre). Un suivi de la germination des sclérotés et de l'apparition du miellat, a été réalisé pour les deux années. Pour suivre la dispersion de l'agent pathogène, deux études ont été menées :

- en 2012 : Dispersion des ascospores par le vent grâce à des pièges à spores.
- en 2013 : Dispersion des conidies, contenues dans le miellat, par les arthropodes. Dans cette étude, une cage de protection a été installée pour limiter la contamination par les ascospores et a été enlevée dès l'apparition du miellat à l'intérieur.

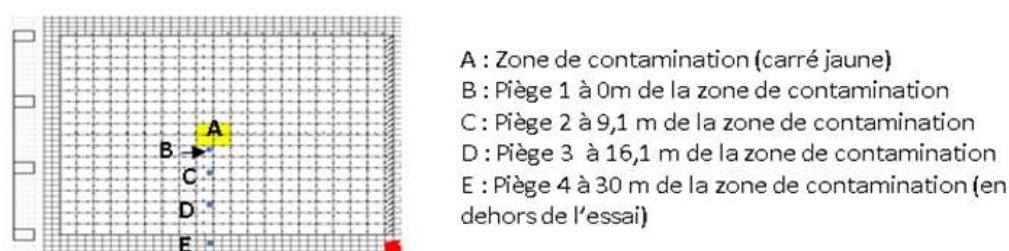
Figure 1: Photographie aérienne de l'essai dispersion
(Aerial photography of dispersion trial)



Piégeage des ascospores de *Claviceps purpurea*, essai 2012 :

La capture a été réalisée quotidiennement du 16 mai au 03 juillet 2012 par quatre pièges à spores associés à des panneaux solaires et positionnés à 0m, 9,1 m, 16,1m et 30m de la zone de contamination (Figure 2). Les bandes ont été montées sur un tambour rotatif, installé à l'intérieur du piège et ont été changées tous les cinq jours. Les bandes ont été identifiées et annotées avant d'être conservées à -20°C jusqu'à l'analyse.

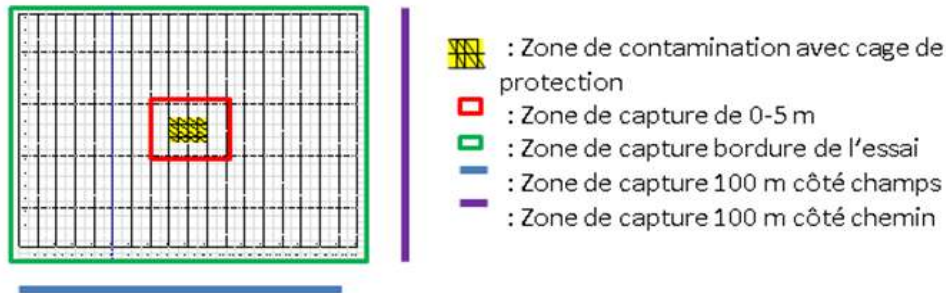
Figure 2: Positionnement des pièges à spores dans l'essai dispersion
(Disposition of spore traps in dispersion trial)



Captures des insectes, essai 2013 :

Les captures ont été réalisées à six dates (le 26 juin, le 01, 04, 10 et 31 juillet ainsi que le 25 septembre 2013) et dans quatre zones de captures (0-5 m, bordure, 100m côté chemin et 100m côté champ de la zone de capture) (Figure 3) à l'aide de filet fauchoir. Tous les insectes capturés ont été triés par genre pour chaque jour et lieu de capture puis conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

Figure 3: Zones de captures des insectes
(Capture area for insects)



DETECTION ET QUANTIFICATION DE *C. PURPUREA* PAR PCR EN TEMPS REEL

La mise au point de la technique de détection et de quantification de *C. purpurea* spécifique du groupe G1 a été réalisée en se basant sur les travaux décrits par Tooley (Tooley et al., 2001). La spécificité et la robustesse de la méthode développée ont été testées à partir des recommandations établies dans la norme AFNOR NF V03-110 (procédure de validation intra laboratoire d'une méthode alternative à partir d'une méthode de référence) et du guide d'accréditation COFRAC concernant la détection d'ADN issus d'OGM végétaux (soja, maïs et colza).

Souche de référence de *Claviceps purpurea* :

La souche de référence de *Claviceps purpurea* utilisée pour le développement de la méthode de détection et de quantification de *C. purpurea* par PCR en temps réel, est la souche CL13002 issue de la mycothèque du laboratoire de pathologie végétale d'Arvalis. Cette souche, isolée en 2013, provient de la germination d'un sclérote issu de l'essai dispersion 2013. La souche est cultivée sur milieu gélosé T2 en chambre de culture à 25°C, hygrométrie à 70% et une photopériode de douze heures (Amici et al., 1967).

Préparation et broyage des échantillons :

Le mycélium de *C. purpurea* a été préalablement lyophilisé puis broyé au broyeur à bille MM400 de Retsch (2 billes de 3 mm de diamètre, 45 sec à une fréquence de 30 m.s⁻¹).

Les grains issus des enquêtes agriculteurs ont été broyés à 1 mm et aliquotés à 50 mg dans un tube de 2 mL.

Les insectes capturés : un à trois insectes d'un même genre en fonction du nombre prélevé. Ils ont été placés dans un tube de 1,5 mL, puis plongés dans l'azote liquide et broyés à l'aide d'un pic de broyage.

Les bandes de pièges à spores : chaque bande a été préalablement découpée dans le sens de la longueur afin d'obtenir deux bandes de largeurs égales. Des sections correspondant à une demi-journée de piégeage ont ensuite été réalisées pour faciliter l'étape de broyage. Les deux sections correspondant à une journée ont ensuite été réunies lors de l'extraction. Seules les sections issues de la partie supérieure de la bande ont été analysées, les autres ont été conservées pour une observation microscopique.

Deux louches de billes en verres (0,75 – 1 mm de diamètre ; Retsch), équivalent à 20 µL, ont été utilisées. Deux sessions de broyages d'une durée d'une minute à 6 m.s⁻¹ avec un FastPrep © 24 Instrument ont été nécessaires.

Extraction d'ADN de *C. purpurea* à partir de farine, d'insectes et des bandes de pièges à spores :
L'extraction d'ADN du mycélium de *C.purpurea*, des farines, des insectes et des bandes de pièges à spores ont été réalisées avec le kit DNeasy Plant Mini Kit Qiagen © selon le protocole modifié *Qiagen Purification of total DNA from Plant Tissue (Mini protocol)*. L'ADN récupéré a été conservé à -20°C.

PCR en temps réel :
La méthode de détection et de quantification de *Claviceps purpurea* du groupe G1 est basée sur la technologie Taqman© et cible le gène de la Betatubuline.
Le mix de qPCR est composé de 5 µL d'échantillon, 12,5 µL de qPCR Mastermix Plus with UNG (Eurogentec), 0.125 µL de sonde à 10 µM, 0,7 5µL de chacune des amorces à 10 µM et de 5,875 µL d'eau ultra pure (Millipore).
Le cycle d'amplification est de 10 min à 95°C, suivie de 40 cycles composés de 15 sec à 95°C, puis 1min à 62°C. Une gamme standard avec des quantités d'ADN mycélien (de 5 ng à 0,005 ng) a été utilisée à chaque analyse. Les quantifications ont été réalisées avec les appareils ABI 7900d'Applied Biosystem et du CFX 96 de Biorad. Chaque échantillon a été analysé en duplicata et les quatre points de gamme (5, 0,5, 0,05 et 0.005 ng) ont été réalisés en triplicata.

RESULTATS

DETECTION ET QUANTIFICATION DE *C. PURPUREA* PAR PCR EN TEMPS REEL

Dans le cadre de la mise au point d'une nouvelle méthode de détection et de quantification par PCR en temps réel, différents tests sont nécessaires pour pouvoir affirmer que la méthode est fiable, spécifique et robuste. Nous ne présentons que le test de spécificité de la méthode. Les autres tests (limites de détection et de quantification, la répétabilité et la reproductibilité) ont également été réalisés avec succès mais ne sont pas présentés ici.

Spécificité de la méthode :

La première étape dans le développement d'un nouvel outil moléculaire est de vérifier s'il est spécifique de la cible recherchée. La méthode a été testée sur différentes souches du genre *Claviceps*, mais également sur d'autres genres de champignons pathogènes présents sur les épis, seuls les résultats des principales souches testées sont présentées ici (Tableau I).

Aucun signal n'a été détecté pour les différents agents pathogènes des épis testés. De plus, seules les souches du groupe G1 ont été quantifiées. La méthode développée est donc bien spécifique de l'agent pathogène recherché. Les autres critères (linéarité, reproductibilité et répétabilité) nécessaires à la validation de la méthode ont également été validés statistiquement (données non présentées).

Application de l'outil pour l'étude de la dispersion de *C. purpurea*

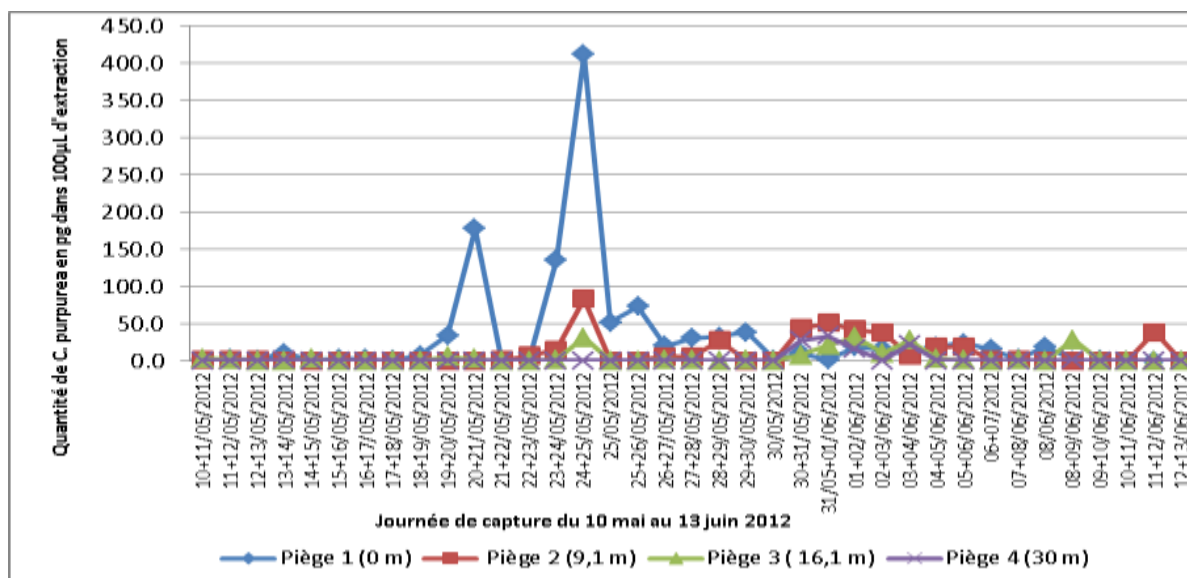
Dispersion de l'inoculum primaire (ascospores issues des sclérotés):

La Figure 4 représente les quantifications de *C. purpurea* obtenues sur la période de piégeage allant du 10 mai au 13 juin 2012 pour les quatre pièges. Les quantifications réalisées ont montré que le piège 1 (0 m) est celui qui a capté le plus d'ascospores de *C. purpurea* avec deux principaux pics les 20-21 mai et le 24-25 mai 2012, suivi par le piège 2 (9,1m) et le pièges 3 (16,1m) dans une plus faible mesure. *C. purpurea* n'a pas été quantifié avec le piège 4 (30m).

Tableau I: Liste des principales souches testées pour le test de spécificité.
(List of principal strains tested for the specificity test).

Genre	Espèce	Groupe	Plante hôte	Résultat (Ct moyen)
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	G1	<i>Secale cereale</i>	24,58
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	G1	<i>Festuca arundinacea</i>	25,06
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	G2	<i>Dactylis sp.</i>	Non détecté
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	G2	<i>Ammophila b</i>	Non détecté
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	G3	<i>Spartina anglica</i>	Non détecté
<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	?	<i>Molinia caerulea</i>	Non détecté
<i>Claviceps</i>	<i>eriochloae</i>		<i>Eriochloa sericea</i>	Non détecté
<i>Claviceps</i>	<i>africana</i>		<i>Sorghum bicolor</i>	Non détecté
<i>Claviceps</i>	<i>fusiformis</i>		<i>Pennisetum g</i>	Non détecté
<i>Fusarium</i>	<i>graminearum</i>		<i>Triticum aestivum</i>	Non détecté
<i>Microdochium</i>	<i>nivale</i>		<i>Triticum aestivum</i>	Non détecté
<i>Microdochium</i>	<i>majus</i>		<i>Triticum aestivum</i>	Non détecté

Figure 4: Quantification de *C. purpurea* (pg/ 100µL d'extraction) par journée de piégeage
(Quantification of *C. purpurea* (pg / 100 µL of extraction) by trapping day).

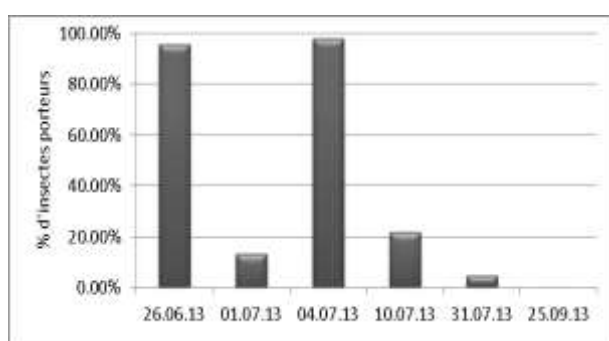


Dispersion de l'inoculum secondaire (conidies) :

234 échantillons ont été recensés et analysés, avec notamment 75 échantillons de diptères, 51 d'hémiptères et 42 de coléoptères.

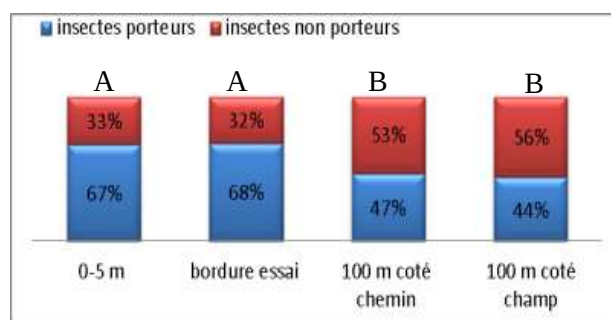
De l'ADN de *C. purpurea* a été détecté lors des prélèvements du 26 juin 2013 et sur les quatre prélèvements du mois de juillet 2013 (Figure 5). Avec 95 % et 98 % d'insectes porteurs, la détection d'ADN a été majoritaire le 26 juin et le 4 juillet 2013. Les trois autres prélèvements de juillet ont présenté un pourcentage d'insectes porteurs plus faible allant de 21 % (10/07/13) à 5% (31/07/13). Aucune amplification n'a été notée pour la capture du 25 septembre. Ces résultats ont également permis de montrer l'activité des insectes sur l'essai pendant la saison ; une décroissance du nombre d'individus porteurs a été observée en fonction de la disparition du miellat sur les épis (notations réalisées en 2013, données non présentées).

Figure 5: Pourcentage d'insectes porteurs de spores de *C. purpurea*.
(Percentage of insects carrying *C. Purpurea* spores).



Les distinctions des taux d'insectes porteurs et non porteurs de conidies selon les zones de captures (toutes dates confondues) ont permis de mettre en évidence que le taux d'insectes potentiellement vecteurs a été plus important en intra-parcelle (Figure 6). En effet, la zone de 0-5 m et la bordure d'essai ont présenté un taux d'individus porteurs similaire. A 100 m de l'inoculum du côté chemin et du côté champ, les taux d'insectes positifs ont également été similaires entre eux. Ainsi, deux zones de dispersion ont pu être distinguées et validées par un test de Student.

Figure 6: Proportion des insectes capturés par zone de piégeage, toutes dates confondues.
(Proportion of insects captured by trapping area from all dates).

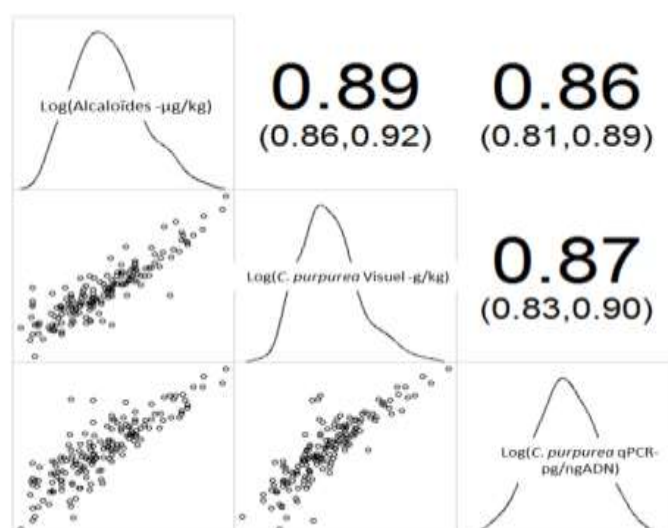


Corrélations entre différents indicateurs de la présence d'ergot

Pour l'ensemble des mesures effectuées sur les 171 échantillons, les résultats ont été transformés en log afin d'obtenir une distribution normale des résidus. Le corrélogramme réalisé sous R met en évidence une bonne corrélation entre les trois critères analytiques testés (Log (alcaloïdes), log (*C.purpurea* visuel) et log (*C.purpurea* qPCR), les coefficients de corrélation variant de 0.86 à 0.89 (Figure 7).

Le développement d'un modèle linéaire mixte expliquant la teneur en alcaloïdes avec la teneur en *C. purpurea* par qPCR permet de définir que 73% des teneurs en alcaloïdes sont expliquées par l'analyse qPCR.

Figure 7: Corrélogramme entre le log (alcaloïdes- $\mu\text{g/kg}$), le log (*C. purpurea* visuel-g/kg) et le log (*C. purpurea* qPCR-pg/ng ADN)
(Correlogram between log (alkaloids - $\mu\text{g/kg}$), log (visual *C.purpurea* – g/kg) and log (*C. purpurea* qPCR - pg/ng DNA))



DISCUSSION

Une méthode de quantification moléculaire inédite de *Claviceps purpurea* spécifique du groupe G1 a été mise au point et validée par différents tests qui ont montré que la méthode développée est spécifique, répétable et reproductible permettant une utilisation intra laboratoire en routine. Ces paramètres permettent d'affirmer que la quantification de *Claviceps purpurea* spécifique du groupe G1 dans différentes matrices ne comporte pas de biais. Ainsi, nous avons développé une méthode de quantification robuste de cet agent pathogène.

Ce nouvel outil nous a permis d'étudier l'impact de deux vecteurs : abiotique et biotique sur la dispersion des inocula primaire et secondaire. L'étude de la quantification des ascospores (inoculum primaire) piégées dans les bandes de pièges à spore a mis en évidence un schéma de dispersion de type en foyer. Le piège 1, situé devant la zone de contamination, a enregistré les taux d'ADN de *C. purpurea* les plus forts avec notamment deux pics les 20-21 mai et le 24-25 mai 2012. Ensuite, la quantité d'ADN décroît avec la distance de piégeage. Ces données concordent avec les observations obtenues lors de l'étude de la localisation et du nombre de sclérotés dans l'essai (C. Maumené *et al.*,

2013) qui a montré que 95% des ascospores se disséminent dans un rayon de 20 m, et que la distance à la zone de contamination explique 53% de la variabilité des teneurs en ergot.

Cet outil nous a également permis d'évaluer la dispersion de l'inoculum secondaire (conidies contenues dans le miellat) par les arthropodes. Les quantifications moléculaires réalisées sur les insectes prélevés en 2013 ont mis en évidence la présence de spores de *C. purpurea* sur les insectes notamment à deux dates, le 26 juin et le 4 juillet. La première concorde au jour d'ouverture de la cage au centre de l'essai, qui correspond au réservoir d'inoculum pour l'ensemble de l'essai. A cette date, aucun miellat n'a été observé sur l'essai or les insectes prélevés ce jour-là sont déjà porteurs d'ADN de *Claviceps purpurea*. Cette constatation signifie que le miellat présent sur ces insectes provenait d'autres graminées que celles cultivées. Les graminées adventices en bordure de champs ou dans la parcelle elle-même, atteignant le stade floraison avant la culture, ont probablement été sécrétrices de miellat et visitées par les insectes. Ainsi, les graminées adventices joueraient bien le rôle de plante relais et d'amplificateurs de la dispersion de la maladie, (Seaman, 1980 ; Bonin *et al.*, 2013). Le 4 juillet, la présence de miellat sur les céréales a été observée et cette date correspond au deuxième pic de détection d'ADN sur les insectes. Ceci signifie que les insectes ont eu une activité croissante à l'intérieur de l'essai depuis le retrait de la cage et qu'ils ont pu participer à la contamination des épillets des plantes cultivées. L'étude prouve que les insectes peuvent être qualifiés de porteurs de conidies et que l'outil développé pourrait être utilisé pour comprendre la dispersion de l'inoculum secondaire par des vecteurs biotiques. Néanmoins, l'outil seul ne permet pas de savoir si les insectes sont un facteur aggravant important dans les épidémies de *C. purpurea*.

Pour toutes les dates confondues, nous avons constaté une similarité du taux d'insectes porteurs de conidies dans la zone 0-5 mètres de l'inoculum et la bordure d'essai. La même constatation a été faite pour les prélèvements à 100 mètres de l'essai. Les insectes les plus fortement concentrés en ADN d'ergot (26.06 et 10.07.13) sont aussi répartis dans les deux zones les plus proches de l'inoculum. Ainsi, les conidies seraient essentiellement véhiculées par les insectes de manière localisée et il paraît probable qu'ils participent à contaminer les épillets sains d'un même épi. Mais ces vecteurs prospectent également à plus grande échelle, vers les prairies là où la diversité écologique est plus grande que dans la parcelle. Dans notre cas, nous avons détecté des conidies sur des insectes jusqu'à 100 mètres de l'essai, par conséquent, il serait possible que les conidies soient véhiculées à plus longue distance mais nos données ne sont pas suffisantes pour l'affirmer.

Nous avons également étudié la corrélation entre la quantité d'ADN de *C. purpurea* et la teneur en alcaloïdes dans les échantillons prélevés dans les parcelles agriculteurs. Les données brutes de cette étude montrent que la variable « teneur en alcaloïdes » est expliquée à plus de 73% par la concentration en ADN de *C. purpurea* pour toutes les cultures. En prenant en compte ces résultats statistiques, nous sommes en mesure d'affirmer qu'il existe une bonne corrélation entre la quantification d'ADN de *C. purpurea* et la teneur en alcaloïdes. Ainsi même si il existe une variabilité de la teneur en alcaloïdes entre sclérotés, plus le champignon est quantifié par son « marqueur ADN » dans un lot de grain, plus le risque de retrouver dans la farine une quantité importante d'alcaloïdes est élevée. La détermination de *C. purpurea* par qPCR pourrait donc être utilisée pour quantifier la présence de l'agent pathogène dans les lots de grain, mais également dans les produits transformés où la détermination visuelle de l'ergot est rendue impossible.

CONCLUSION

Ce travail a permis de développer une méthode de détection et de quantification spécifique de *Claviceps purpurea* du groupe G1 par PCR en temps réel. Elle a pu être appliquée à différentes matrices et ainsi répondre aux objectifs posés. En premier lieu, l'application de cette méthode a permis d'évaluer la capacité de dispersion de l'inoculum primaire par le vent. Cette dissémination de *C. purpurea* se fait en foyer sur une courte distance n'excédant guère 20 mètres. En second lieu,

nous avons mesuré la présence de l'inoculum secondaire porté par des arthropodes. Cette dissémination semble plus importante. Elle concerne tout le champ d'expérimentation mais également les parcelles voisines. Ces constats sont cohérents avec les descriptions de la dispersion de l'ergot. L'intérêt de la méthode moléculaire pour suivre la dispersion de la maladie est vérifié dans cette étude.

Enfin, cette méthode de qPCR a permis de quantifier l'ADN de *C. purpurea* dans des lots ergotés de graminées cultivées dans l'objectif de trouver le meilleur indicateur de l'état sanitaire d'un lot destiné à l'alimentation. Nous avons ainsi pu établir l'existence d'une corrélation entre la quantité d'ADN de *C. purpurea*, la teneur en ergot et la teneur en alcaloïdes dans les lots analysés. Cette utilisation de l'outil pourra être envisagée pour définir efficacement la qualité sanitaire des céréales et produits à bases de céréales, et les risques pour les consommateurs.

Notre outil offre un large choix d'utilisation, aussi bien pour la communauté scientifique en poursuivant l'acquisition de données sur la dissémination de *C. purpurea* mais également pour les filières agroalimentaires pour identifier des lots à risque qui devront faire l'objet de procédures de gestion adaptées.

REMERCIEMENTS

Cette étude a reçu le soutien financier de FranceAgriMer pour la détermination visuelle de l'ergot et la teneur en alcaloïdes.

Merci à l'Institut de Microbiologie de l'Academy of Science of the Czech Republic (ASCR) de nous avoir fourni les différentes souches du genre *Claviceps*.

BIBLIOGRAPHIE

Amici A.M., Minghetti A., Scotti T., Spalla C., Tognoli L., 1967 - Ergotamine production in submerged culture and physiology of *Claviceps purpurea*. *Applied Microbiology*, 15, 597-602.

Bonin L., Orlando B., Gautellier-Vizioz L., 2013 - Impact des pratiques de désherbage dans la gestion du risque *Claviceps purpurea*. Synthèse des essais 2013. Arvalis-Institut du Végétal.

Hardy T.N, 1988 - Gathering of fungal honeydew by *Polistes* spp. (Hymenoptera : Vespidae) and potential transmission of the causal ergot fungus. *Florida Entomologist*, 71, 374-376.

Lee M.R., 2009 - The history of ergot of rye (*Claviceps purpurea*) I: from antiquity to 1900. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 39, 179-184.

Maumené C., Orlando B., 2013- Dossier ergot des céréales - Enquêtes : l'ergot et ses alcaloïdes détectés de plus en plus souvent . *Perspective Agricole*, 402, 34-37.

Pažoutová S., Olšovská J., Linka M., Kolínská R., Flieger M., 2000 - Chemoraces and habitat specialization of *Claviceps purpurea* populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5419-5425.

Pažoutová S., Parbery D.P., 1999 - The taxonomy and phylogeny of *Claviceps*. In *The Genus Claviceps*. Eds Kren V and Cvak L., CRC Press, Boca Raton, 57-77.

Pažoutová S., Rehacek Z., Vorisek J., 1980 - Induction of sclerotial-like mycelium in axenic cultures of *Claviceps purpurea* producing clavine alkaloids. *Canadian Journal of Microbiology*, 26, 363-370.

Rapilly F., 1968 - Etudes sur l'ergot du blé : *Claviceps purpurea* (FR.) Tul. *Ann. Epiphyties*, 19, 305-329.

Seaman W.L., 1980 - L'ergot des céréales et des graminées fourragères. *Agriculture Canada*, Publication no. 1438.

Tenberge K.B., 1999 - Biology and life strategy of the ergot fungi. Ergot: The genus *Claviceps*. Eds Kren V and Cvak L., Harwood Academic Publishers, 25-56.

Tooley P.W., Goley E.D., Carras M.M., Frederick R.D., Weber E.L., Kuldau E.L., 2001- Characterization of *Claviceps* species pathogenic on sorghum by sequence analysis of the β -tubulin gene intron 3 region and EF-1 α gene intron 4. *Mycologia*, 93 (3), 541-551.

Norme et Guide :

Guide d'accréditation COFRAC concernant la détection d'ADN issus d'OGM végétaux (soja, maïs et colza). Document LAB GTA 02, Révision 01- Mars 2008.

Norme AFNOR NF V03-110 « Analyse des produits agricoles et alimentaires – procédure de validation intra laboratoire – cas de méthodes d'analyse quantitative », 2010.