

AFPP – 23^e CONFÉRENCE DU COLUMA
JOURNÉES INTERNATIONALES SUR LA LUTTE CONTRE LES MAUVAISES HERBES
DIJON – 6, 7 ET 8 DÉCEMBRE 2016

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE CANDIDATS D'ORIGINE NATURELLE A ACTION
HERBICIDE POUR CONTROLER LES ADVENTICES**

M. TRIOLET ^(1,2), O. ANDRE ⁽²⁾, C. STEINBERG ⁽¹⁾, S. CORDEAU ⁽¹⁾, J.-P. GUILLEMIN ⁽¹⁾

⁽¹⁾ UMR Agroécologie, AgroSup Dijon, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon

⁽²⁾ Société DE SANGOSSE, Lieu-dit Rue Bonnel, 47480 Pont-du-Casse

marion.triolet@inra.fr, andreo@desangosse.com, christian.steinberg@inra.fr,
stephane.cordeau@inra.fr, jean-philippe.guillemain@agrosupdijon.fr

RÉSUMÉ

Depuis plusieurs années, la France a engagé une politique de réduction des intrants issus de la chimie de synthèse. Toutefois, face à la demande croissante de produits issus de l'agriculture, il est indispensable de garantir les rendements agricoles. Des solutions alternatives doivent donc être proposées, et parmi elles, l'utilisation de produits d'origine naturelle est privilégiée. Dans la lutte contre les adventices et la gestion des phénomènes de résistance aux herbicides observés chez certaines espèces d'adventices, une des voies de recherche consiste à identifier des microorganismes à action herbicide. Une collaboration a ainsi été initiée entre l'UMR Agroécologie de Dijon et l'entreprise De Sangosse. Cette présentation fait état de l'avancement des premières étapes de cette démarche. Des adventices symptomatiques sont collectées pour étudier la diversité des microorganismes endophytes, pour isoler des microorganismes potentiellement pathogènes, pour vérifier les postulats de Koch et caractériser leur pouvoir pathogène. Les modes d'action conduisant à la mort des adventices seront recherchés pour identifier les métabolites responsables et les valoriser comme bioherbicides.

Mots-clés : bioherbicide, diversité génétique, interactions adventice-microorganismes, modes d'action, lutte biologique.

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS ACTING AS NATURAL HERBICIDE TO MANAGE WEEDS

The use of herbicides to control weeds is very common. However, some herbicides are both environmentally detrimental and human unhealthy. The use of microorganisms acting as natural herbicide could be an alternative control method. Symptomatic weeds will be collected in field. Microorganisms will be isolated from symptomatic weeds, purified, identified and inoculated on weeds to confirm Koch's postulates. The identified pathogenic microorganisms will be tested against a selection of weeds and crops to characterize the host range and the specificity of these microorganisms. In parallel, the diversity of endophytic microorganisms of symptomatic weeds will be characterized by high-throughput sequencing of microbial barcodes. This approach will allow to identify microorganisms unable to grow rapidly on media. Eventually, the modes of action leading to death of weeds will be sought to identify those responsible and value as metabolites bioherbicides.

Keywords: biocontrol, bioherbicide, genetic diversity, microorganism-weed interactions, modes of action.

INTRODUCTION

Les mauvaises herbes sont depuis toujours un problème pour les agriculteurs. D'après Choppin de Janvry (1980), le terme mauvaise herbe, couramment employé pour désigner toute plante indésirable, est de moins en moins utilisé du fait de sa connotation négative. Il est remplacé par le terme adventice. Les adventices sont définies comme étant des plantes qui poussent dans un champ cultivé, sans y avoir été intentionnellement introduites par l'agriculteur (Morlon, 2011). Les adventices présentes au sein des cultures sont nuisibles car elles entrent en compétition pour les ressources (eau, espace, nutriments...). En outre, les adventices sont considérées comme des plantes réservoirs pour des ravageurs ou des agents pathogènes (Suty, 2010). Les adventices seraient ainsi à l'origine de 34% de pertes de rendement, en grandes cultures et en productions horticoles à l'échelle mondiale (Institut Agronomique Méditerranéen de Zaragoza, 2012). Cependant les adventices sont également connues pour assurer des services écosystémiques dans les paysages agricoles (Cordeau *et al.*, 2016).

Les stratégies de gestion des adventices peuvent être variées, mais l'utilisation d'herbicides de synthèse est la plus répandue, en particulier en Europe. En effet, pour assurer un fort accroissement de la production agricole du XX^{ème} siècle, une utilisation massive d'intrants issus de la chimie de synthèse (produits phytopharmaceutiques ou pesticides) s'est imposée, laissant ainsi une moindre place à l'évolution des mécanismes naturels d'adaptation des plantes aux conditions environnementales. L'utilisation des herbicides est ainsi ancrée dans les systèmes agricoles et dans la protection des JEV (Jardins, Espaces Verts et Infrastructures). Le marché en France et en Europe des herbicides est équivalent à celui des fongicides et des insecticides réunis (UIPP, 2015). Cependant, si l'utilisation intensive des herbicides au cours des cinquantes dernières années a permis un gain de productivité, elle s'est aussi accompagnée d'impacts écotoxiques dommageables globalement pour l'environnement, mais aussi directement pour les utilisateurs, ce qui a remis en cause l'usage de molécules herbicides. Sur les 15 molécules provenant de produits de protection des végétaux trouvés dans les cours d'eau en France en 2012, les plus fréquemment identifiées étaient des herbicides ou leurs métabolites dérivés (Ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie, 2013). Depuis plusieurs années, la France a mis en place une politique de réduction drastique des produits phytopharmaceutiques dans le cadre du plan Ecophyto, renforcé par l'adoption la loi d'Avenir pour l'Agriculture. Progressivement, certains produits ont été retirés du marché. Dans ce contexte, il apparaît indispensable de proposer des solutions alternatives capables de maintenir les rendements des productions agricoles dans le cadre d'une agriculture respectueuse de l'environnement. La recherche et l'utilisation de produits d'origine naturelle (substances naturelles, microorganismes) sont désormais largement privilégiées de sorte que le marché des produits de biocontrôle bénéficie d'une croissance positive de l'ordre de 15% par an au niveau mondial.

Le biocontrôle est défini, comme étant l'utilisation de mécanismes et d'interactions naturels qui régissent les relations entre espèces. Les produits de biocontrôle représentent un ensemble d'outils à utiliser, seuls ou associés à d'autres moyens de protection des plantes, notamment en lutte intégrée (Herth, 2011).

L'analyse de la littérature scientifique souligne le potentiel des microorganismes et des extraits de plantes comme bioherbicides mais révèle aussi le très faible nombre de molécules d'origine naturelle à effet herbicide identifiées et valorisées jusqu'à présent, ainsi que la rareté des études décrivant les mécanismes impliqués dans leur activité herbicide (Triolet, 2015). Entre 1980 et 2001, huit bioherbicides commercialisés (Charudattan, 2001). En vingt ans, le nombre de biopesticides a augmenté dans le monde, cependant la part des bioherbicides représente moins de 10% de tous les biopesticides (biofongicides, biobactéricides, bioinsecticides et bionématicides). Quelques produits ont été proposés depuis, grâce à une législation nord américaine plus souple, mais ils ont rapidement été éliminés pour cause d'inefficacité. A ce jour, seuls quelques pays commercialisent des bioherbicides parmi lesquels le Canada (trois), les Etats-Unis (quatre), l'Ukraine (un) (Bailey, 2014). Depuis 2015, la France a autorisé la commercialisation de Beloukha®, un bioherbicide, à base d'acide nonanoïque. Si la littérature scientifique fait état de nombreux candidats

potentiels prometteurs en conditions contrôlées, seules 12 solutions bioherbicides commerciales sont sur le marché (Ghorbani *et al.*, 2005 ; Bailey, 2014). Outre le fait que la formulation de ces produits puisse constituer un obstacle technique important, il apparaît surtout que les travaux sur les bioherbicides ont été principalement réalisés par des laboratoires de recherche spécialistes en phytopathologie et mycologie et très peu par des laboratoires de malherbologie (Ash, 2010). En effet, l'unicité d'hôte très souvent rencontrée dans les études scientifiques n'a jamais poussé les malherbologues à étudier le potentiel herbicide des agents pathogènes des adventices. Les cas d'études identifiées dans la littérature se limitent souvent à l'interaction spécifique du modèle d'étude. Au regard de l'importance du marché des herbicides, des attentes en matière de produits de biocontrôle et du faible développement des bioherbicides, il existe un intérêt majeur à conduire un projet de recherche pour identifier des bioherbicides et développer de nouvelles offres alternatives en lutte intégrée contre les adventices.

Dans ce contexte, la société De Sangosse et l'UMR Agroécologie de l'INRA de Dijon ont établi une collaboration pour identifier des candidats d'origine naturelle ayant des activités "herbicides" et développer des produits de biocontrôle des adventices. Compte tenu de leurs compétences respectives et complémentaires, la société De Sangosse se focalisera sur la recherche de substances naturelles produites par des plantes et des microorganismes pathogènes d'adventices et des métabolites produits lors de l'interaction symptomatique.

La démarche, conduite au sein de la société De Sangosse et décrite brièvement ci-dessous ne sera pas détaillée dans cette présentation et fera l'objet d'une communication ultérieure. Elle consistera d'abord à identifier des candidats grâce à des données scientifiques qu'elles soient bibliographiques ou expérimentales. Ces candidats peuvent être des exsudats de culture, des microorganismes phytopathogènes ou des extraits de plantes allélopathiques. Ces candidats à tester seront obtenus soit par la culture de microorganismes sélectionnés dans la collection MIAE (Microorganismes d'Intérêt Agronomique et Environnemental) de l'UMR, soit sélectionnés dans les collections d'extraits végétaux de partenaires au projet. Ces candidats seront criblés pour leur activité toxique vis-à-vis d'espèces modèles indicatrices de phytotoxicité par des procédés de criblage à haut débit afin de présélectionner des candidats ayant une activité intéressante. Ces approches impliquent l'utilisation d'organismes modèles (microorganismes et plantes) avec des méthodes de culture miniaturisées et à haut débit afin de réaliser le criblage d'un grand nombre de candidats.

En revanche, le poster et le présent document font état des premières étapes de la démarche conduite au sein de l'UMR Agroécologie, c'est-à-dire celles relatives à la combinaison d'une méthode d'isolement classique (microbiologie pasteurienne) et une méthode moléculaire caractérisant la diversité des microorganismes endophytes susceptibles de révéler des génotypes que la microbiologie n'aurait pu mettre en évidence.

Concrètement, il s'agira de prospecter et collecter des adventices symptomatiques, d'isoler les microorganismes associés aux symptômes et de tester leur pathogénicité au laboratoire. Parallèlement, les mêmes échantillons d'adventices symptomatiques et non symptomatiques seront soumis à une extraction d'ADN pour évaluer la diversité des microorganismes endophytes des adventices symptomatiques cibles afin d'identifier des taxons potentiellement pathogènes de ces plantes et de les isoler sur des milieux appropriés ou bien de rechercher leur équivalent taxonomique dans la collection MIAE de l'UMR Agroécologie de Dijon. Outre l'accès à une source potentielle d'agents de biocontrôle des adventices sur lesquelles ils ont été identifiés, cette démarche innovante fournira des informations concernant les interactions entre les adventices et la biodiversité microbienne.

A l'issue des tests d'activités bioherbicides, les candidats présélectionnés seront testés en serre sur les adventices dont ils sont issus, afin de vérifier les postulats de Koch, puis sur un panel d'adventices pour tester leur caractère bioherbicide sur un spectre d'hôtes. Les candidats qui présenteront les meilleurs potentiels seront sélectionnés sur des critères d'efficacité et de

sélectivité. Ces candidats seront identifiés par des approches moléculaires dans le cas de microorganismes (UMR Agroécologie) et biochimiques dans le cas d'extraits végétaux (Société De Sangosse). L'identification des candidats sera suivie par une caractérisation de leur mode d'action afin de permettre le développement d'un produit de biocontrôle. En effet, la connaissance du mode d'action permettrait d'identifier un ou plusieurs métabolites responsables de l'affaiblissement ou de la mort de la ou des adventices, d'optimiser les étapes de production, de formulation et de définition des conditions d'application d'un produit. Le ou les bioherbicides retenus pourront ainsi être produits à base de molécules d'origine naturelle et être proposés comme alternative à l'utilisation d'herbicides d'origine de synthèse chimique.

MATERIEL ET MÉTHODES

PRELEVEMENT DES ADVENTICES

Les prélèvements d'adventices sur le terrain répondent à deux objectifs. Le premier est d'isoler des microorganismes pathogènes des adventices et ainsi constituer une collection. Le second est d'évaluer la diversité des microorganismes endophytes des adventices, c'est pourquoi des adventices symptomatiques et non symptomatiques de la même espèce sont récoltées, ainsi que des plantes de culture dans la même parcelle. Ces collectes sont réalisées, essentiellement en parcelle agricole et dans trois zones définies en France. Deux zones sont localisées en Bourgogne (Dijon Nord (Châtillonnais) et Dijon Sud (Val de Saône)) et une zone dans la région de la Beauce. Une liste de 25 adventices a été établie. Suite à une analyse bibliographique, ces adventices ont été choisies car elles sont parmi les plus représentées dans les champs cultivés en France, les plus concurrentielles et les plus citées dans la littérature scientifique (Triolet, 2015).

Tableau I : Liste des 25 adventices sélectionnées
List of 25 selected weeds

	Nom commun	Nom scientifique	Famille	Code EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization)
1	Amarante réfléchie	<i>Amaranthus retroflexus</i>	Amaranthaceae	AMARE
2	Ambrosie à feuilles d'armoise	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Asteraceae	AMBEL
3	Brome stérile	<i>Bromus sterilis</i>	Poaceae	BROST
4	Chardon des champs	<i>Cirsium arvense</i>	Asteraceae	CIRAR
5	Chénopode blanc	<i>Chenopodium album</i>	Chenopodiaceae	CHEAL
6	Chiendent rampant	<i>Elytrigia repens</i>	Poaceae	AGRRE
7	Coquelicot	<i>Papaver rhoeas</i>	Papaveraceae	PAPRH
8	Digitaire sanguine	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Poaceae	DIGSA
9	Folle avoine	<i>Avena fatua</i>	Poaceae	AVEFA
10	Gaillet gratteron	<i>Galium aparine</i>	Rubiaceae	GALAP
11	Géranium disséqué	<i>Geranium dissectum</i>	Geraniaceae	GERDI
12	Ivraie raide	<i>Lolium rigidum</i>	Poaceae	LOLRI
13	Liseron des champs	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	CONAR
14	Morelle noire	<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae	SOLNI
15	Moutarde des champs	<i>Sinapis arvensis</i>	Brassicaceae	SINAR
16	Panic pied-de-coq	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Poaceae	ECHCG
17	Prêle des champs	<i>Equisetum arvense</i>	Equisetaceae	EQUAR
18	Renouée des oiseaux	<i>Polygonum aviculare</i>	Polygonaceae	POLAV
19	Renouée liseron	<i>Fallopia convolvulus</i>	Polygonaceae	POLCO
20	Rumex à feuilles obtuses	<i>Rumex obtusifolius</i>	Polygonaceae	RUMOB
21	Séneçon commun	<i>Senecio vulgaris</i>	Asteraceae	SENVU
22	Sétaire verte	<i>Setaria viridis</i>	Poaceae	SETVI
23	Véronique de Perse	<i>Veronica persica</i>	Scrophulariaceae	VERPE
24	Vulpie queue-de-rat	<i>Vulpia myuros</i>	Poaceae	VLPMY
25	Vulpin des champs	<i>Alopecurus myosuroides</i>	Poaceae	ALOMY

Pour collecter les adventices, un protocole de prélèvement a été établi. Les adventices à prélever doivent faire partie de la liste et présenter des symptômes. Les adventices symptomatiques et leurs homologues non symptomatiques sont à prendre en cinq exemplaires. En outre et si cela est possible, les adventices symptomatiques et asymptomatiques d'une même espèce sont récoltés au même stade phénologique. Néanmoins, plusieurs stades phénologiques peuvent également être pris en compte si l'occasion se présente. Les cultures autour ou à proximité des adventices symptomatiques sont prélevées en cinq exemplaires, afin de détecter les éventuels transferts de microorganismes entre adventices et plantes cultivées. Les adventices sont identifiées par un numéro qui correspond à l'ordre, la date et le lieu de prélèvement. Les adventices sont conservées à 4°C si nécessaire jusqu'aux isolements.

Pour chaque adventice symptomatique ou non symptomatique, une fiche terrain est complétée avec le plus de précisions possibles telles que le stade phénologique, l'état sanitaire de la plante, le site et la date de prélèvement mais aussi l'historique de la parcelle.

ISOLEMENTS DES MICROORGANISMES

A partir des adventices symptomatiques, des microorganismes (essentiellement fongiques) associés aux symptômes sont isolés. Pour isoler les microorganismes des adventices, les symptômes issus principalement de feuilles ou de tiges sont désinfectés superficiellement. La désinfection se fait près d'un bec bunsen, avec un bain d'alcool à 70°C et deux bains d'eau stérile. Avec une pince, les morceaux de feuilles ou tiges sont pris individuellement et déposés pendant 15 secondes dans le bain d'alcool puis transférés dans les deux bains d'eau stérile pendant 15 secondes chacun. Une fois désinfectés, ils sont séchés sur du papier absorbant stérile et déposés sur les boîtes de Petri correspondantes. Ces dernières sont numérotées avec les mêmes identifiants que ceux utilisés pour les adventices. Les boîtes de Petri contiennent un milieu malt gélosé complété en antibiotiques (Streptomycine 100 mg.L⁻¹ et Chlortétracycline 50 mg.L⁻¹) et en acide citrique à 250 mg.L⁻¹. L'opération est répétée pour chacune des adventices symptomatiques prélevées. Il est possible que pour une même adventice, plusieurs isolements soient effectués à partir d'organes différents. Les boîtes de Petri sont ensuite incubées à température ambiante et en lumière naturelle entre 7 à 10 jours.

Les microorganismes développés sur milieu sont repiqués individuellement sur milieu de malt gélosé. Les microorganismes issus de symptômes de plantes sont identifiés avec un code alpha numérique :

Adventice : Chénopode blanc (*Chenopodium album*)

Numéro : 83

Champignons : a, b, c, d, e

Pour cet exemple, les microorganismes sont donc les 83a, 83b, 83c, 83d et 83e. Tous les champignons isolés sont ainsi codés et repiqués 3 fois sur milieu malt gélosé avec des antibiotiques et de l'acide citrique. Ces repiquages permettent de purifier les isolats. Ces derniers sont ensuite repiqués en tube sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar, 39 g.L⁻¹) pour être conservés.

ETUDE DE DIVERSITE DES MICROORGANISMES ENDOPHYTES

Parallèlement aux analyses microbiologiques, les adventices symptomatiques, non symptomatiques et les plantes cultivées prélevées sont également désinfectées superficiellement. Les morceaux d'adventices désinfectés dépendent des symptômes. Si par exemple les symptômes se trouvent sur les feuilles, cinq feuilles sont choisies sur les cinq adventices symptomatiques prélevées et cinq feuilles sont choisies sur l'homologue non symptomatique. Sur les plants de la culture, ce sont toujours les feuilles qui sont prélevées. Le protocole de désinfection est le même que celui décrit précédemment. Au fur et à mesure de la désinfection, les échantillons sont mis dans des cryo-tubes

notés avec le numéro de l'adventice et le numéro de la répétition (1, 2, 3, 4 ou 5). Les échantillons sont mis au congélateur à -20°C puis lyophilisés pour conserver au mieux le matériel fongique présent dans le matériel végétal. Après lyophilisation, les échantillons sont stockés au congélateur à -20°C.

MISE AU POINT D'UNE METHODE DE SCREENING D'AGENTS PATHOGENES

Avant de tester les microorganismes pour leur activité pathogène sur plantes adventices entières, il a été nécessaire de miniaturiser ce screening. En effet, les tests de pathogénicité sont sensibles à différents paramètres qui doivent être contrôlés. Parmi ces paramètres il y a notamment celui des contaminations croisées, quand plusieurs microorganismes doivent être testés en même temps, celui des répétitions, ceux des modes d'inoculation et des conditions d'incubation incluant la durée, la température, l'hygrométrie et l'éclairage. Il a donc été décidé de tester ces microorganismes sur feuilles d'adventices détachées, dans un système clos. La faisabilité de ce type de tests a été étudiée en utilisant des pathosystèmes témoins sélectionnés pour représenter au mieux la liste des 25 adventices.

Pathosystèmes témoins

Le pathosystème *Colletotrichum graminicola*/Maïs (*Zea mays*) a été choisi pour représenter la famille des monocotylédones. Cet agent pathogène est responsable de l'Anthracnose, c'est un hémibiotrophe, cultivable sur milieu PDA. L'apparition des symptômes après inoculation se fait entre 48 et 72h sur plante entière (Münch *et al.*, 2008). Le maïs appartient à la famille des Poacées, famille représentative des adventices sélectionnées.

Le pathosystème *Alternaria brassicicola*/Chou (*Brassica oleracea*) a été choisi pour représenter la classe des dicotylédones. Cet agent pathogène est responsable du Black Spot (Alternariose), c'est un champignon nécrotrophe, également cultivable sur milieu PDA. Comme dans le cas précédent, l'apparition des symptômes se fait entre 48h et 72h (Pochon *et al.*, 2012).

Matériel fongique

La souche de *Colletotrichum graminicola* a été fournie par l'INRA de Grignon. Cette souche a été codée MIAE1823 pour entrer dans la collection MIAE de l'UMR Agroécologie de Dijon.

La souche d'*Alternaria brassicicola* provient de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS) et l'équipe Fungisem. Cette souche est la souche 43, « Abra43 », elle a été codée MIAE1824 pour entrer dans la collection MIAE.

La souche *Fusarium oxysporum* Fo47 codée MIAE0047 est une souche qui n'a pas de pouvoir pathogène connu fournie par l'UMR Agroécologie de Dijon et sera utilisée comme témoin.

Matériel végétal

Les choux (*Brassica oleracea*) utilisés sont de la variété « Chou Cabus Quintal d'Alsace » et les semences proviennent du commerce. Les semences de maïs utilisés sont enrobées et la variété choisie (RAGT TETRAXX) est utilisée en production de maïs fourrage.

Dispositif expérimental

Le dispositif utilisé est un système clos composé de différentes boîtes en plastique ou mini-serres. Au fond de ces mini-serres, de l'eau stérile est versée pour garantir une forte hygrométrie. Une mini-serre est mise en place pour chaque pathosystème. Dans chaque mini-serre, trois modalités sont testées, avec cinq répétitions (cinq feuilles) par modalité. Par exemple, pour le pathosystème chou/*Alternaria brassicicola*, les trois modalités sont : les feuilles de chou seules (observation du

comportement), les feuilles de choux inoculées avec la souche MIAE0047 (témoin non pathogène), les feuilles de choux inoculées avec la souche MIAE1824 (référence pathogène).

Screening miniaturisé

Les choux sont utilisés au stade « 3-4 feuilles » et les maïs au stade « 5-6 feuilles ». Les feuilles de chacune des espèces sont détachées de la plante entière et déposées sur le papier filtre humidifié.

Les suspensions de mycélium sont produites en mettant 4 ml d'adjuvant dans une boîte de Petri de 5 cm de diamètre, dans laquelle le champignon d'intérêt s'est développé depuis une dizaine de jours. La surface de la culture est alors grattée délicatement pour décoller le mycélium et les éventuelles spores. Les suspensions sont ensuite récupérées et mises dans un pulvérisateur en verre de 5 ml. Les feuilles sont inoculées par pulvérisation en conditions contrôlées, en dehors de la mini-serre avant d'être replacées sur le papier filtre dans la mini-serre. L'inoculation terminée, les mini-serres sont stockées en chambre climatique, en conditions contrôlées. Directement après inoculation, les mini-serres témoins contenant les feuilles de choux et les feuilles de maïs inoculées avec respectivement les souches MIAE1824 et MIAE1823 sont placées à l'obscurité pendant 48h.

RESULTATS

ADVENTICES ET MICROORGANISMES ISOLES

A ce jour, les adventices prélevées au cours des différentes campagnes ont permis de rassembler 112 souches fongiques, provenant d'une vingtaine d'adventices prélevées sur les trois zones définies (Tableau II).

Tableau II : Liste des microorganismes isolés par adventice
List of microorganisms isolated by weed

Nom commun plante	Souches	Total
Amarante réfléchie	5bis – 13bis – 90a	3
Brome stérile	84a, b – 93a	3
Chardon des champs	71a – 95(1)a feuille – 95(1)a tige – 95(2)a	4
Chénopode blanc	66a, b – 78a, b – 91a, b, c – 91(2)a, b	9
Chiendent rampant	88a, b, c	3
Coquelicot	76a feuille – 76a tige	2
Digitaire sanguine	1 – 2 – 5	3
Folle avoine	61a - 69a, b, c, d, e, f – 77a, b, c – 86a	11
Géranium disséqué	65a, b, c, d, e, f – 74a	7
Ivraie raide	79a, b – 80a, b, c – 83a, b, c, d, e – 97a, b	12
Liseron des champs	1bis – 8 -14bis – 15 – 18 - 68a, b, c, d, e (Désinfecté) – 68a, b, c, d (non désinfecté) – 70a, b – 98a	17
Morelle noire	67a, b, c, d, e, f	6
Panic-pied-de-coq	10 – 96a – 99a	3
Prêle des champs	60a, b, c – 81a, b, c tige – 81a écorce	8
Renouée des oiseaux	13 – 55 - 59a, b, c, d (Désinfecté) - 59a (non désinfecté) – 72a, b	9
Renouée liseron	19 - 56a, b, c	4
Sénéçon commun	89a	1
Sétaire verte	3 – 9	2
Vulpin des champs	87(1)a – 87(2)a, b – 94a, b	5

MISE AU POINT D'UNE METHODE DE SCREENING D'AGENTS PATHOGENES

Les feuilles inoculées à J+0 sont saines et de couleur vertes. A J+7, les feuilles de choux et de maïs pour les modalités « Témoin » et « MIAE0047 » sont légèrement sénescentes mais non symptomatiques et celles inoculées avec leurs agents pathogènes respectifs présentent des symptômes.

Pour le chou, quelques symptômes de chlorose apparaissent dans les deux premières modalités, mais le comportement des feuilles est compatible avec le test. Il n'y a aucun effet avec le

champignon non pathogène MIAE0047. La présence de feuilles noires observés sur la modalité avec l'agent pathogène MIAE1824 confirme que l'inoculation a été efficace.

Pour le maïs, les feuilles des deux premières modalités sont sénescentes et il n'y a aucun effet avec le champignon non pathogène MIAE0047. Les taches noires observées le long des nervures des feuilles de maïs confirment la présence de l'agent pathogène MIAE1823 et donc que l'inoculation est réussie.

Figure 1 : Symptômes observés sur feuilles de chou et de maïs 7 jours post inoculation
Symptoms observed on leaves of cabbage and maize 7 days post inoculation



DISCUSSION

Lors des campagnes de prélèvements, une grande diversité d'adventices est rencontrée et la recherche d'adventices symptomatiques n'est pas toujours aisée. En effet, comme pour les cultures, il faut que certaines conditions climatiques soient réunies pour que des maladies se développent. Une des faiblesses de cette approche réside dans le fait que les adventices infectées par des agents pathogènes agressifs et virulents, et donc les plus intéressants potentiellement, sont souvent déjà mortes et difficilement accessibles. Celles en décomposition sont habituellement colonisées par des saprophytes à partir desquelles il est difficile d'isoler l'agent pathogène primaire. Une autre faiblesse de cette approche microbiologique est de ne révéler que les microorganismes opportunistes capables de se développer très rapidement sur le milieu d'isolement. L'approche moléculaire devrait palier cette faiblesse en révélant des génotypes nouveaux dont les homologues existent dans la collection MIAE ou pour lesquels des milieux d'isolement appropriés seront utilisés afin de tester leur potentiel pathogène. Néanmoins, 112 souches de microorganismes potentiellement pathogènes des mauvaises herbes ont déjà été isolées. Cette collection est stockée sur tube de PDA pour être soumise au screening d'activité pathogène à l'aide de la méthode développée en mini-serre tests avec les pathosytèmes témoins conduits en parallèle pour garantir l'interprétation des résultats.

En effet, tester les microorganismes directement sur adventices dans les serres pouvait être sources d'erreurs liées notamment aux risques de contaminations croisées. C'est la raison pour laquelle, un test de screening miniaturisé en mini-serre individualisant chaque isolat à tester sur sa plante d'origine, en conditions contrôlées reproductibles, a été développé. Ce type de tests consistant à tester les microorganismes sur feuilles d'adventices détachées a déjà été utilisé avec succès en expérimentation (Gilchrist et Grogan, 1975; Bompeix *et al.*, 1980; Sharma *et al.*, 2004). L'utilisation de

deux pathosytèmes différents pour étalonner l'expérience a permis de tester un certain nombre de paramètres, telles que les méthodes d'inoculation, l'utilisation et la sélection d'adjuvants, les conditions climatiques... Les résultats de ces tests sur pathosytèmes connus ont permis d'établir un protocole précis pour les tests qui seront effectués sur adventices. Ainsi, l'inoculation par pulvérisation, l'hygrométrie élevée grâce à un volume d'eau définie mis au fond des boîtes, les conditions climatiques (22°C le jour /19°C la nuit pour une photopériode de 8h/16h), l'utilisation d'un adjuvant et la répétition des tests au moins deux fois ont été déterminées.

Ces résultats, en système clos, sur feuilles détachées, montrent donc des résultats très prometteurs et permettent de n'avoir aucune contamination croisée pouvant conduire à des faux positifs et à la sélection de candidats non pathogènes. De la même manière, les pathosytèmes témoins seront systématiquement conduits parallèlement aux tests effectués sur les isolats afin de s'assurer que les conditions de fonctionnement du système de screening étaient réunies et d'éviter ainsi tout faux négatif risquant d'éliminer un candidat intéressant alors que l'absence de symptôme pourrait être due à un facteur externe à l'activité pathogène de cet isolat.

CONCLUSION

L'objectif de cette présentation était d'exposer l'état d'avancement d'une démarche entreprise en mars 2016. Seules les premières étapes ont pu être exposées, néanmoins, un certain nombre de résultats prometteurs permettent d'envisager que les objectifs pourront être atteints dans le cadre du projet. En effet, une première collection d'isolats fongiques potentiellement pathogènes des adventices a été constituée. Cette collection s'enrichit régulièrement grâce à une campagne de prélèvements continue de mai à octobre 2016 et susceptible de se répéter de mai à octobre 2017. Une plus value originale sera apportée à cette collection avec les candidats potentiels qui seront révélés par l'analyse comparative de la diversité des endophytes de plantes adventices symptomatiques et non symptomatiques ainsi que celles des plantes cultivées dans les parcelles prospectées. En outre, cette analyse moléculaire de la diversité des endophytes des adventices devrait apporter un éclairage nouveau sur les interactions entre adventices et microorganismes et ainsi participer à l'élaboration de méthodes de gestion des adventices *in situ* en utilisant la microflore indigène.

Sur le plan méthodologique, nous avons mis au point un test miniaturisé de screening des microorganismes d'adventice qui devrait permettre de repérer rapidement des candidats potentiels au sein de la collection constituée, enrichie de la collection MIAE.

En routine, le test miniaturisé sur feuilles détachées permettrait de tester environ 400 microorganismes par an. Les premiers tests sur adventices sont en cours d'expérimentation et les premiers résultats sont encourageants. Les microorganismes causant des symptômes sur feuilles détachées d'adventices seront sélectionnés pour être testés sur les adventices en plante entière dont ils sont issus. Ce passage sur plante entière sera nécessaire pour confirmer les postulats de Koch puis pour caractériser le spectre d'activité.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient chaleureusement Carole Reibel pour ses compétences en malherbologie et Nadine Gautheron pour ses compétences en mycologie, ainsi que le personnel de la serre de l'INRA de Dijon pour l'entretien des différentes plantes nécessaires aux expérimentations. M. Triolet bénéficie d'une allocation de thèse CIFRE n°2015/1280.

BIBLIOGRAPHIE

- Ash G.-J., 2010 - The Science, Art and Business of Successful Bioherbicides. *Biological Control* 52, 3, 230-240.
- Bailey K.-L. 2014. The Bioherbicide Approach to Weed Control Using Plant Pathogens. *In Integrated Pest Management Current Concepts and Ecological Perspective*. Edition Dharam P Abrol, Academic P, Elsevier, 245–266.
- Bompeix G., Ravisé A., Raynal G., Fettuouche F., Durand M.-C., 1980 - Modalités de l'obtention des nécroses bloquantes sur feuilles détachées de tomate par l'action du tris-o-éthyl phosphonate d'aluminium (phoséthyl d'aluminium), hypotheses sur son mode d'action in vivo. *Ann Phytopathol*, 12, 337–351.
- Charudattan R., 2001 - Biological control of weeds by means of plant pathogens : Significance for integrated weed management in modern agro-ecology. *BioControl*, 46, 229–260.
- Choppin de Janvry E., D'Aguiar J., Bailly R., Faivre-Amiot A., 1980 - *Guide pratique de défense des cultures: reconnaissance des ennemis, notions de protection des cultures*. 3ème édition. Editions Le Caroussel et Acta, 419 p.
- Cordeau S., Triolet M., Wayman S., Steinberg C., Guillemin J.-P., 2016 - Bioherbicides: Dead in the Water? A Review of the Existing Products for Integrated Weed Management. *Crop Protection*, 87, 44-49.
- Ghorbani R., Leifert C., Seel W., 2005. Biological control of Weeds with Antagonistic plant Pathogens. *In Advances in Agronomy*. 191–225.
- Gilchrist D.-G., Grogan R.-G., 1975 - Production and Nature of a Host-Specific Toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, 66, 165-171.
- Herth A., 2011 - Le bio-contrôle ». Résumé du rapport du député Herth, avril. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/110420_biocontrrole.pdf.
- Institut Agronomique Méditerranéen de Zaragoza., 2012 - Gestion des mauvaises herbes dans l'agriculture actuelle.
- Ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie., 2013 - Les pesticides les plus rencontrés dans les cours d'eau [L'essentiel sur..., Environnement, Les pesticides dans les eaux] : Observation et statistiques. <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/211/pesticides-plus-rencontres-cours-deau.html>.
- Morlon P., 2011 - Adventice - Les Mots de l'agronomie . <http://mots-agronomie.inra.fr/mots-agronomie.fr/index.php/Adventice>.
- Münch S., Lingner U., Floss D.-S., Ludwig N., Sauer N., Holger B.-D., 2008 - The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, Compatibility in host-microbe interactions: strategies and perspectives, 165, 1, 41-51.
- Pochon S., Terrasson E., Guillemette T., Lacombe-Vasilescu B., Georgeault S., Juchaux M., Berruyer R., Debeaujon I., Simoneau P., Champion C., 2012 - The *Arabidopsis thaliana*-*Alternaria brassicicola* pathosystem: a model interaction for investigating seed transmission of necrotrophic fungi. *Plant methods*, 8, 1, 1.
- Sharma P., Sharma S.-R., Sindhu M., 2004 - A detached leaf technique for evaluation of resistance in cabbage and cauliflower against three major pathogens. *Indian Phytopathology*, 57, 3, 315-318.
- Suty L., 2010. La lutte biologique: vers de nouveaux équilibres écologiques. *Editions Quae*. 334 p.
- Triolet M., 2015. *Etude des connaissances sur le biocontrôle pour lutter contre les adventices : Les bioherbicides*. Rapport bibliographique. De Sangosse & UMR1347 Agroécologie de Dijon (INRA et AgroSup Dijon). 47 pages
- UIPP., 2015 - Rapport d'activité 2015 de l'UIPP. 9 p.