

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**UTILISATION RAISONNÉE DES FONGICIDES ET APPORT DES BIOFONGICIDES POUR LUTTER CONTRE
LA FUSARIOSE DES ÉPIS DE BLES**

H. BATINA ⁽¹⁾, V. ATANASOVA-PENICHON ⁽²⁾, A. FOURREY ⁽³⁾, S. GELISSE ⁽¹⁾, G. GRIGNON ⁽³⁾,
V. LAVAL ⁽¹⁾, C. MAUMENE ⁽³⁾, B. MELEARD ⁽³⁾, R. VALADE ⁽⁴⁾, A.-S. WALKER ⁽¹⁾, E. GOURDAIN ⁽³⁾

⁽¹⁾ UR 1290 BIOGER – CPP INRA-AgroParisTech

⁽²⁾ INRA-MycSa Mycologie et Sécurité des Aliments Unité 1264 BP81 33883 Villenave d'Ornon Cedex

⁽³⁾ ARVALIS-Institut du végétal Station expérimentale 91720 Boigneville

⁽⁴⁾ ARVALIS-Institut du végétal Laboratoire de Pathologie Végétale

^{(1) (4)} avenue Lucien Brétignières BP 01 78 850 Thiverval-Grignon

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 ont 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 : lutte agronomique et lutte génétique ; (iii) le raisonnement de la lutte chimique : optimisation des traitements classiques et évaluation de nouvelles molécules issues de la chimie verte. Cet article fait le point sur ce troisième axe.

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

ABSTRACT

Fusarium head blight is a cereal disease caused by a complex of several species of fungi (*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, called EcoFusa, was, by the availability of molecular tools for quantification of *Fusarium* and *Microdochium* key species to better understand the interactions between wheat, pathogens and toxins through their modulation by agronomic practices and weather. Three major themes were developed (i) quantification of the main fungal 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: agronomic and genetic control; (iii) reasoning of chemical control: optimization of conventional treatment and evaluation of new molecules from green chemistry. This paper is focused on the last theme.

Key-words : *Fusarium* head blight, molecular biology, mycotoxins , alternative control.

INTRODUCTION

La fusariose de l'épi est une maladie du blé induite par un complexe d'espèces présentes selon des fréquences variables sur les grains. Certaines années, elle peut occasionner des pertes importantes de rendement pour les producteurs. Dans des essais réalisés par ARVALIS-Institut du végétal entre 2007 et 2009 en région Centre, la nuisibilité moyenne associée aux attaques de « fusarioses » est estimée en moyenne à 15 q/ha. Ainsi, les années à « fusarioses » peuvent engendrer des pertes économiques conséquentes pour un agriculteur, d'autant plus que le traitement fongicide, dans des conditions optimales d'application, ne permet de ne récupérer que 10 qx/ha. 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 1er 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 caractères épidémiologiques différents. Ainsi, deux genres fongiques sont principalement impliqués dans la fusariose du blé tendre comme du blé dur en Europe : *Microdochium*, avec deux espèces majoritaires récemment distinguées *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 and Perrone, 2002 ; Iosif 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*. Parmi les méthodes de lutte contre la fusariose des épis, la lutte prophylactique est un moyen efficace de réduire le risque associé à *Fusarium graminearum* mais dont les conséquences sur *Microdochium* et les autres espèces fusariennes sont méconnues. Les facteurs de risque identifiés pour la lutte contre *F. graminearum* sont le précédent cultural, le travail du sol et la sensibilité variétale (Obst and Bechtel, 2000 ; Schaafsma et al., 2001 ; Barrier-Guillot et al., 2006 ; Lemmens, 2007 ; Gourdain et al., 2009). Par ailleurs, la lutte chimique tient une place encore marquée pour réduire le risque « fusarioses » et depuis la mise en place de la 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 méritaient 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 100% alimentation humaine et des variétés 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 bio-fongicides pourrait s'avérer une solution alternative incontournable.

Ainsi, afin de mieux comprendre les interactions entre plante / 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 lutttes alternatives', soutenu financièrement par le CASDAR. Cet article fait le point sur les principaux résultats obtenus en matière de raisonnement de la lutte chimique, à savoir, *avec quelles molécules traiter* : optimisation des traitements classiques et évaluation de nouvelles molécules issues de la chimie verte et *à quel moment traiter* : couplage d'une quantification moléculaire à un dispositif de piégeage d'ascospore à des fins d'évaluation du risque « fusariose ». Un autre article (Gourdain et al. 2015) détaille les résultats en matière de lutte prophylactique.

1-OPTIMISATION DE LA LUTTE CHIMIQUE CONTRE LA FUSARIOSE EN FONCTION DU SPECTRE DES MATIERES ACTIVES UTILISEES ET DU STATUT DE LA RESISTANCE

Les objectifs ont été (i) d'étudier la pression de sélection exercée sur les différentes espèces de *Fusarium* et *Microdochium* par les principales familles de molécules fongicides utilisées, triazoles, strobilurines et benzimidazoles ; (ii) d'évaluer l'impact d'une résistance émergente, aux strobilurines en particulier, sur l'efficacité de la lutte et sur la qualité sanitaire finale.

MATERIEL ET METHODES

Deux essais spécifiques de lutte fongicide caractérisés par une pression fongique différente ont été mis en place pendant les 3 années du projet sur la station expérimentale ARVALIS de Boigneville (91): un essai avec des cannes de maïs appliquées au sol et brumisé pendant la floraison des blés (favorisant *F. graminearum* ; essai ECOFUSA) et un essai où *Microdochium* est inoculé (essai FUMANI). La souche de *Microdochium* a été choisie pour sa résistance caractérisée aux strobilurines et benzimidazoles. Les modalités suivies étaient : témoin non traité, triazole, triazole + strobilurine et triazole + méthyl thiophanate.

En plus des notations d'efficacité, des échantillons de grains ont été prélevés à la récolte, préparés puis envoyés vers un laboratoire sous-traitant pour un suivi de microbiologie et un isolement des souches de *Microdochium* permettant de quantifier ce genre dans la flore modalitaire. Parallèlement, la quantification respective des deux espèces de *Microdochium* et de leurs résistances aux fongicides a été entreprise par trois méthodes : (1) par un test biologique, où le champignon est exposé à des doses discriminantes de matières actives représentant les 3 familles citées plus haut ; (2) par un test moléculaire (test CAPS) permettant de détecter la substitution G143A de la protéine du cytochrome b, corrélée avec la résistance aux strobilurines. Un autre test CAPS permet de préciser les espèces de *Microdochium* (*M. nivale* / *M. majus*), non déterminable par le test biologique ; (3) par un test moléculaire de quantification directe des allèles résistants (strobilurines et benzimidazoles) au sein des 2 espèces de *Microdochium*. Par ailleurs, une analyse de DON par un laboratoire sous-traitant complète la gamme des résultats.

RESULTATS

Efficacité des différentes spécialités dans les 2 types d'essai

En conditions naturelles de contamination, résidus de maïs et brumisation, la flore reste largement dominée par *Microdochium spp* sur les 3 années. La nature de l'espèce dominante, *M. majus* ou *M. nivale*, mais surtout la fréquence de la résistance au sein de chacune des deux espèces principales affectent les résultats d'efficacité, de rendement et de teneur en DON.

Solutions à base de triazoles :

Le tébuconazole est peu efficace sur les différentes espèces de *Microdochium*. Bien que peu efficace sur ces espèces, les teneurs en DON qui lui sont associées restent parmi les plus faibles, soulignant son bon niveau d'activité sur *F. graminearum*, principal producteur de DON. Le prothioconazole, efficace sur *Microdochium spp*, mais également sur *F. graminearum*, associé au tébuconazole donne les meilleurs résultats d'efficacité et de rendement avec des teneurs en DON parmi les plus faibles.

- Solutions à base de strobilurines :

L'adjonction de strobilurines est le plus souvent sans effet ni sur l'efficacité, ni sur le rendement du fait de la résistance aux QoI très implantée chez les deux espèces de *Microdochium*. En présence de souches sensibles en proportion suffisante, les strobilurines peuvent permettre d'améliorer l'efficacité et le rendement des triazoles auxquelles elles sont associées. Dans le cas de l'association tébuconazole + azoxystrobine les teneurs en DON sont plus élevées dans les grains que ceux traités par les triazoles seules. Pour l'application de l'association prothioconazole + fluoxastrobine, la fluoxastrobine semble sans effet et n'influence pas négativement l'activité du prothioconazole, intrinsèquement élevée.

- Solution à base de triazoles, associées aux benzimidazoles :

L'apport de méthyl thiophanate en mélange avec le tébuconazole est bénéfique sur le rendement et l'efficacité seulement en présence de souches de *Microdochium spp.* sensibles à cette substance active. Les teneurs en DON sont majoritairement plus élevées que pour les triazoles seules.

D'une manière générale, les efficacités et les rendements apparaissent très corrélés sur l'ensemble des essais. En revanche, les teneurs en DON semblent plus indépendantes de l'efficacité. Ce sont les quantités de *F. graminearum*, résiduelles après traitement, estimées par un test biologique ou mieux par une analyse moléculaire, qui prédisent le mieux la teneur en DON de la récolte. Parmi les solutions testées, la spécialité la plus polyvalente Prosaro (à base de prothiconazole et de tébuconazole) est la moins affectée par les résistances et donnent les meilleurs résultats en termes d'efficacité, de rendement et de teneur en DON. Fandango S, bien que contenant une strobilurine, donne des résultats relativement proches.

Concernant les essais FUMANI, une analyse en composantes principales a été réalisée pour étudier les relations entre variables (Figure 6).

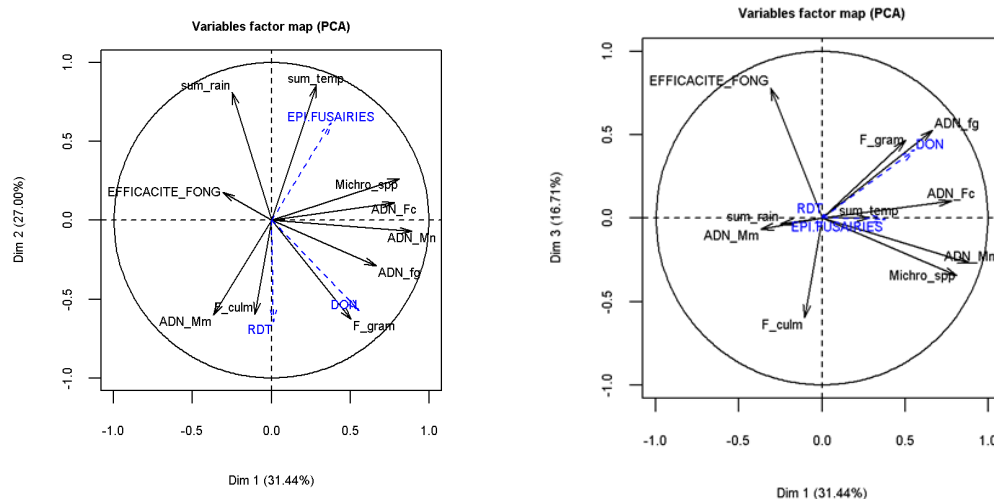


Figure 6: Analyse en Composante Principale des six essais : Axes 1,2 et 1,3 permettent de décrire la structuration des variables : teneur en DON, nb d'épillet fusariés EPI.FUSARIES, rendement RDT, sommes des températures autour de floraison SUM_TEMP, somme des pluies autour de floraison Sum_rain, qPCR et analyse microbiologique *F.graminearum* : ADN_fg et F_gram, *Fusarium culmorum* : ADN_fc et F_culm, *M.nivale* ADN_Mn, *M.majus* ADN_Mm, et *Microdochium spp.* en microbiologie Michro spp.

Figure 6: Principal Component Analysis of the six trials: Axis 1.2 and 1.3 are used to describe the structure of variables: DON content, Fusarium head blight severity EPI.FUSARIES, yield RDT temperatures flowering SUM_TEMP, sum of rain around flowering Sum_rain, qPCR and microbiological analysis for *F.graminearum*: ADN_fg and F_gram, *Fusarium culmorum* and ADN_fc F_culm, *M.nivale* ADN_Mn, *M.majus* ADN_Mm and *Microdochium spp.*, Michro spp.

En conclusion de cette analyse, les champignons sont tous plus ou moins corrélés mais aucun ne s'opposent franchement ; la teneur en DON est très bien corrélée à *F. graminearum* ; le rendement est opposé aux symptômes d'épis fusariés (mais ces variables sont moyennement bien représentées). Le résultat plus surprenant est que la somme des précipitations autour de la floraison est opposée à la quantité de *F. graminearum* et à la teneur en DON.

Pression de sélection mesurée par différentes méthodes

L'analyse par les tests microbiologiques et CAPS des essais ECOFUSA sur les trois années du projet a montré que la flore naturelle de Boigneville était plutôt dominée par l'espèce *M. nivale*. L'efficacité de l'inoculation des essais FUMANI avec une souche de *M. majus* résistante à deux fongicides a été variable, comme le montrent les fréquences de cette espèce dans les témoins d'essai au cours du temps (5 à 70%). Dans un contexte national où l'espèce *M. majus* porte plus fréquemment la double résistance, à la fois aux strobilurines et aux benzimidazoles, ces essais ont permis d'identifier les pressions sélectives décrites ci-dessous.

Solutions à base de triazoles :

Microdochium est intrinsèquement peu sensible au tébuconazole. Dans un bon nombre de situations, ces solutions ont peu modifié la structure phénotypique de la population puisque ce mode d'action contrôle partiellement à la fois les souches sensibles et résistantes aux strobilurines et aux benzimidazoles.

Solutions à base de triazoles associées aux strobilurines :

Les modalités traitées par du tébuconazole associé à l'azoxystrobine ou de la fluoxastrobine ont logiquement vu augmenter la proportion de souches résistantes aux strobilurines, au sein de l'espèce *M. majus* et/ou *M. nivale*.

Solutions à base de triazoles, associées aux benzimidazoles :

Les populations issues des modalités traitées par du tébuconazole associé au thiophanate-méthyl ont vu leur structure se modifier en faveur des souches résistantes aux benzimidazoles.

Pour répondre à la question de l'impact des traitements sur la sélection de flore résistante, une analyse factorielle des correspondances est réalisée et exposée Figure 7.

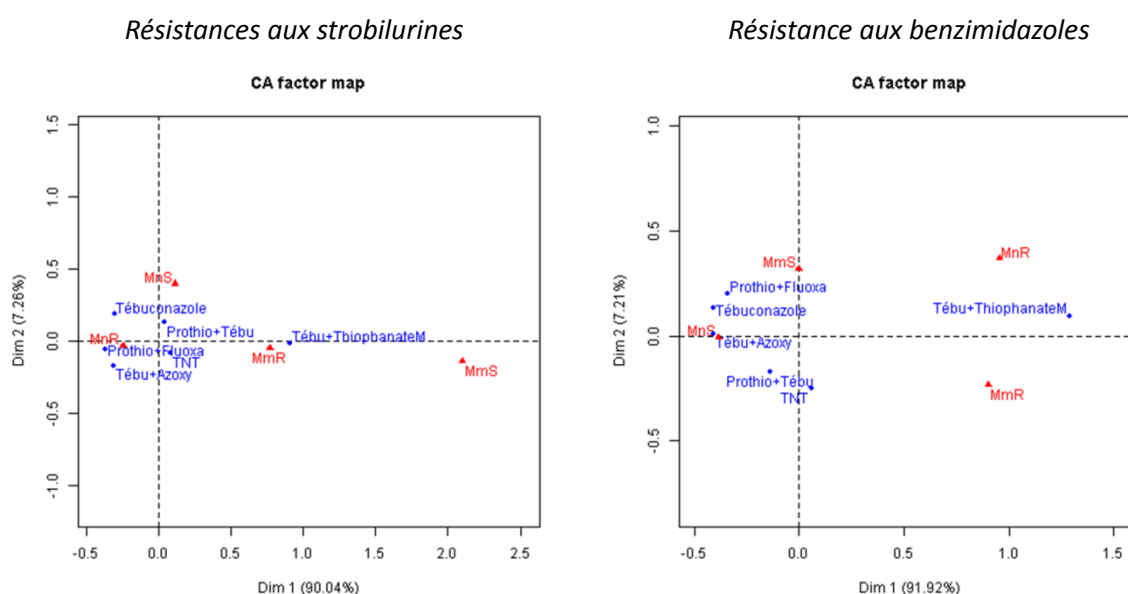


Figure 7 : Analyse factorielle des correspondances : la proximité entre une souche (en rouge) et un traitement (en bleu) signifie que le traitement est associé à un effectif de cette souche important, et par conséquent que le traitement, s'il se distingue du témoin, tend à sélectionner ce type de souche.

Figure 7: Factorial correspondance analysis: the proximity of a strain (red) and treatment (blue) means that the treatment is associated with a significant number of this strain, and therefore the treatment, it stands the witness tends to select this type of strain.

Les souches de *Microdochium nivale* résistantes (MnR) aux strobilurines sont associées aux traitements contenant des strobilurines (azoxystrobine, fluoxastrobine). Les associations tébuconazoles + thiophanate méthyl tendent à sélectionner des souches de *Microdochium majus* et *M. nivale* résistantes aux benzimidazoles (MmR, MnR). L'association tébuconazoles + thiophanate méthyl est associée à des populations importantes de *M. majus* résistantes aux strobilurines (MnR), par un effet d'« ascenseur »¹. Les souches résistantes aux benzimidazoles sont aussi résistantes aux strobilurines.

A noter que dans quelques situations, l'augmentation en fréquence de souches résistantes à l'un des deux modes d'action étudié s'accompagnait, dans la même modalité, d'une augmentation en fréquence de souches résistantes à l'autre, les mutations responsables de ces deux résistances étant régulièrement associées au sein du même isolat (effet « d'auto-stop »).

Le jeu des pressions de sélection est globalement conforme à ce qui était attendu, avec des disparités inter-annuelles reflétant soit les difficultés d'inoculation dans les essais FUMANI, soit la variabilité épidémique naturelle dans les essais ECOFUSA. Globalement, ces résultats confirment que les essais ont été bien menés. Il reste à mesurer si les augmentations en fréquence des différentes résistances réduisent, au moins partiellement, le gain d'efficacité attendu par l'association du tébuconazole, solution de référence dans la lutte contre les maladies de l'épi, aux deux autres modes d'action actifs sur *Microdochium*, et si celui-ci s'accompagne d'une réduction de la production de toxines.

Les dosages d'ADN effectués par les deux duplex Q-PCR pour la résistance aux strobilurines montrent souvent une plus grande proportion de souches *M. nivale* par rapport aux souches *M. majus*. Ceci n'a pas été observé avec les analyses CAPS. Il est à noter que les outils Q-PCR permettent de détecter l'ADN mais cela ne signifie pas que la souche est vivante et active. Ainsi les outils CAPS qui sont basés sur un échantillonnage de souches et les outils Q-PCR basés sur une analyse globale d'échantillon ne permettront pas de comparer exactement les mêmes choses.

2- EVALUATION DE L'EFFICACITE DE BIOMOLECULES POUVANT SE SUBSTITUER AUX FONGICIDES DE SYNTHÈSE POUR LIMITER L'ACCUMULATION DE DON SUR LE BLE TENDRE

Les objectifs ont consisté à (i) identifier des molécules naturelles possédant une efficacité antifongique et "anti-mycotoxines" suffisante pour pouvoir se substituer aux fongicides synthétiques et dont l'approvisionnement permet une application *in vivo* ; (ii) valider l'intérêt de ces biomolécules par une analyse de leur efficacité en plein champ.

MATERIEL ET METHODES

La première partie a consisté à étudier *in vitro* l'efficacité de molécules cibles sur le comportement de différentes souches : 10 souches de *F. graminearum*, 10 de *F. culmorum* et de 2 de *Microdochium*. Après une première série d'analyse, il a été décidé d'augmenter la taille du panel de souches et en particulier de le compléter avec 6 souches supplémentaires de *Microdochium*. Les souches de *Fusarium* ont été choisies de manière à disposer de souches appartenant aux deux espèces (*F. graminearum* et *F. culmorum*) et possédant les trois chémotypes (DON/15-ADON, DON/3-ADON et NIV/FX²) avec un potentiel toxigène différent.

¹ La résistance aux benzimidazoles a été sélectionnée dans les années 80 puis s'est généralisée dans les populations. La résistance aux strobilurines a été sélectionnée plus tardivement, mais sur un fond génétique déjà majoritairement résistant aux benzimidazoles. Les deux mutations sont donc fréquemment associées (résistance multiple) même si elles sont indépendantes. La sélection à l'un de ces modes d'action peut par conséquent entraîner la sélection à l'autre.

² Un chémotype distingue au sein d'une espèce fongique, les souches présentant des variations chimiques de leur métabolite secondaire. Trois chémotypes se distinguent au sein des espèces *F. graminearum* et *F. culmorum*, ceux producteurs de déoxynivalénol et 15-

L'efficacité sur la croissance du champignon et sur sa capacité à produire des toxines a été étudiée pour chaque molécule d'intérêt. Les biomolécules cibles testées sont l'acide caféique, l'acide quinique, l'acide férulique, la curcumine, l'acide chlorogénique et le DiCQ (acide dicaffeoylquinique). Le chitosane a été également testé compte tenu de son effet perturbateur de l'intégrité des membranes fongiques mais aussi stimulateur des défenses naturelles des plantes. L'analyse de son intégration dans des formulations de biofongicides en association avec les composés précédemment cités apparaît très pertinente et a été considérée dans ce volet d'étude. Pour les molécules s'avérant les plus efficaces à réprimer la toxinogénèse, une approche moléculaire Q-RT-PCR a été entreprise. L'impact du dérivé naturel sur l'expression de certains des gènes Tri, gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes, a été caractérisé. Les molécules qui ont montré l'efficacité la plus importante vis-à-vis de la croissance fongique et production de toxines au cours de ces études *in vitro* ont été testées au champ.

RESULTATS

Les résultats *in vitro* ont montré que parmi les acides phénoliques testés, l'acide férulique était le plus efficace pour inhiber la croissance fongique. Les souches de *Microdochium* et de *F. graminearum* se sont avérées plus sensibles à cet inhibiteur comparativement aux souches *F. culmorum*. Concernant l'inhibition de la biosynthèse des mycotoxines par *Fusarium*, l'acide caféique ressort comme étant le meilleur inhibiteur parmi les molécules testées. Les études sur l'impact des acides caféique et férulique étudiés seuls et en mélange sur l'expression du gène Tri5 ont montré une inhibition significative dans les cultures supplémentées en acide caféique par rapport au témoin. Afin de compléter les études sur les mécanismes d'action des molécules actives, des études supplémentaires ont été réalisées dans le but de voir si l'effet des acides phénoliques était lié à leurs propriétés antioxydantes. Les résultats ont montré que l'expression des gènes qui codent pour des enzymes fongiques antioxydantes (catalase, superoxydase) était affectée par les traitements avec les acides caféique et férulique. Ces résultats confirment l'existence d'un effet sur le potentiel redox induit par ces acides. Les essais avec le chitosane ont montré que cette molécule inhibe la germination des spores mais pas la croissance fongique. De plus, cette molécule n'augmente pas l'effet inhibiteur des acides phénoliques testés quand elle est ajoutée en association avec l'acide phénolique. De ce fait, le chitosane n'a pas été sélectionné pour les essais au champ.

Compte tenu des résultats obtenus, les acides caféique et férulique ont été retenus pour être testés seuls et en mélange dans les essais au champ conduits en 2012. Ces trois conditions ont été testées en association avec un fongicide pour bénéficier de l'effet formulation. En 2013, une expérience supplémentaire a été réalisée avec la curcumine. Les résultats ont montré que dans les conditions testées, les biomolécules n'avaient pas d'effet sur le développement de *F. graminearum* et sur l'accumulation de déoxynivalénol dans les grains.

3- COUPLAGE D'UNE QUANTIFICATION MOLECULAIRE A UN DISPOSITIF DE PIEGEAGE D'ASCOSPORE A DES FINS D'EVALUATION DU RISQUE « FUSARIOSE »

L'objectif était (i) d'étudier la faisabilité d'une quantification par voie moléculaire des spores à partir des sorties des pièges disposés dans des contextes agronomiques connus et susceptibles de générer des différences qualitatives et quantitatives au niveau des captures en vue d'améliorer à terme, l'estimation précise du risque et du besoin de protection phytosanitaire ; (ii) rapprocher ces résultats avec les données climatiques, les teneurs en ADN dans le grain afin de mieux déterminer les séquences climatiques qui conduisent à l'éjection et l'infection.

MATERIEL ET METHODES

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.

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 7 jours, les bandes ont été remplacées et stockées avant analyse. Les données climatiques associées aux périodes de piégeage ont été également enregistrées.

RESULTATS

Une méthode d'extraction de l'ADN des bandes de pièges à spores a été validée et mise à disposition de tous les partenaires. 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 4 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 n'occurrent 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 piégeages. 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 7).

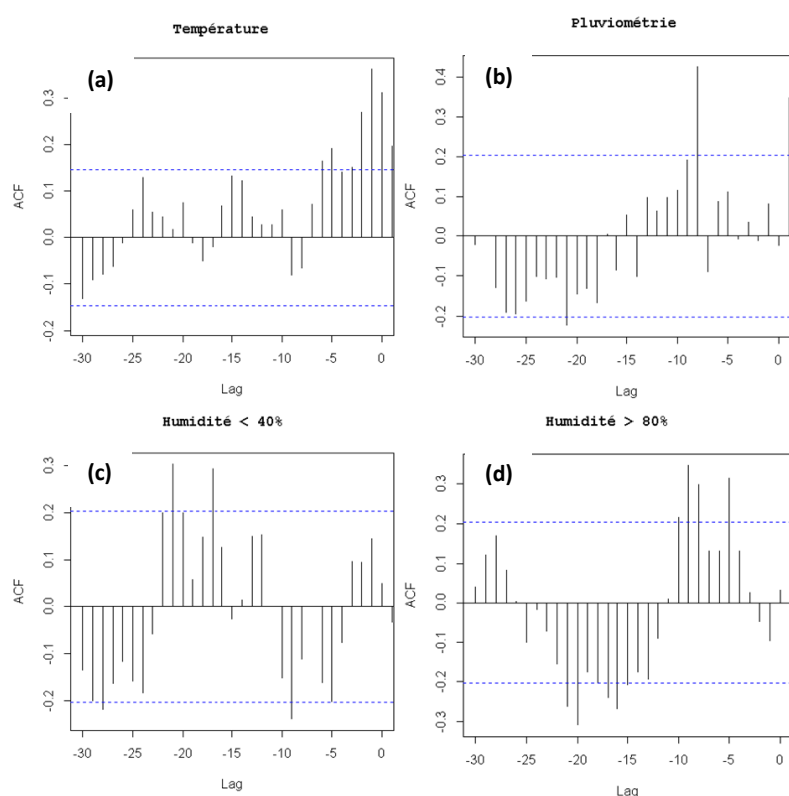


Figure 7: Corrélogrammes de la quantité d'ADN de *F. graminearum* en fonction des différentes variables climatiques pour les années 2012 et 2014. (a) moyenne des températures journalières, (b) cumul des précipitations journalières, (c) cumul du nombre d'heures d'humidité inférieure à 40% et (d) cumul du nombre d'heures avec une humidité supérieure à 80%.

Figure 7: Correlograms of the amount of DNA of *F. graminearum* based on different weather variables for the years 2012 and 2014. (a) Average daily temperatures, (b) accumulated daily precipitation, (c) accumulated number of hours with moisture less than 40%, and (d) accumulated number of hours with moisture greater than 80%.

Ce résultat peut s'expliquer facilement par une forte variabilité entre les 3 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 forest³ a été réalisée mais les résultats n'ont pas été plus concluants. Les analyses sur *Microdochium* doivent encore être réalisées.

CONCLUSIONS

Pour *F. graminearum*, le projet a permis de confirmer l'étroite corrélation entre le champignon et la teneur en DON. Il devrait par ailleurs permettre des avancées dans les années à venir sur la compréhension de l'épidémiologie par l'analyse plus fine des vols de spores en lien avec les épisodes climatiques et le développement de modèles de prévision pour le pilotage du traitement en cours de saison. Cet outil devrait permettre aux agriculteurs de réduire leur intervention aux situations les plus à risque. Néanmoins, la lutte prophylactique peut réduire considérablement le risque associé à *F. graminearum* et limiter par conséquent le recours aux molécules chimiques, même si aucune résistance aux matières actives homologuées n'a été mise en évidence à ce jour. Concernant les deux espèces de *Microdochium*, les études statistiques montrent que les deux espèces ont un comportement proche. Leur statut de résistance aux benzimidazoles et strobilurines est confirmé mais la lutte chimique reste le moyen actuel le plus efficace pour contrôler la maladie. Les travaux entrepris sur les biomolécules ont permis de sélectionner des molécules candidates efficaces pour la lutte contre *Fusarium* et *Microdochium*, même si le passage du laboratoire au champ pose de nombreuses questions, notamment en termes de formulation.

Plus généralement, le projet a mis en évidence que toute méthode de lutte, quelle qu'elle soit, aura un impact sur l'équilibre de la flore et pourra le déplacer d'une population vers une autre, comme démontré dans l'étude de l'impact des fongicides. C'est donc bien par la prise en compte de cet équilibre et de la proportion entre les espèces présentes, et le cas échéant leur statut de résistance, que les méthodes de lutte doivent s'orienter. L'arrivée des analyses par Q-PCR, rapides et peu coûteuses, pourra être une aide précieuse pour leur caractérisation. Les résultats obtenus dans ce projet feront l'objet dans les mois à venir d'analyses plus approfondies sur ces proportions afin de proposer *in fine* des outils de pilotage du risque global « fusariose » à travers notamment des modèles de prévision.

PERSPECTIVES

Les données acquises par les outils moléculaires doivent permettre de mettre au point à moyen terme des modèles agro-climatiques de prévision des risques *F. graminearum* et *Microdochium spp.* Les essais fongicides quant à eux, nous permettront de définir les seuils optima de traitement sur les sorties de ces modèles afin de proposer un outil de pilotage de la protection fongicide contre le complexe fusarien en cours de campagne. Ces modèles, si leurs évaluations montrent de bonnes performances, pourront venir alimenter les outils de pilotage existants au sein d'ARVALIS et actuellement proposés aux professionnels du monde agricole (Prévi-LIS®, Farmstar®, plateforme agro-météorologique en cours de développement).

REMERCIEMENTS

En premier lieu, nous remercions la Direction Générale de l'Environnement et la Recherche pour sa contribution financière à ces travaux. Par ailleurs, de nombreux personnels permanents et temporaires (CDD, thésards, stagiaires) des 3 structures impliquées ont contribué de manière significative à la réussite du projet, nous les en remercions.

BIBLIOGRAPHIE

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.

³ La Forêt aléatoire est une méthode qui agglomère l'information provenant de nombreux prédicteurs (ou arbres). Chaque arbre de la forêt est construit par divisions dichotomiques successives d'un sous jeu de données tirées aléatoirement en 2 noyaux fils. A chaque division, la méthode sélectionne parmi un sous ensemble de variables sélectionnées aléatoirement, la variable permettant la meilleure division selon un critère donné.

Mycotoxins and phycotoxins. Advances in determination, toxicology and exposure management. Edited by H. Njapau, S. Trujillo, H.P. van Egmond, D.L. Park. 239-247

Bateman, G.L., Gutteridge, R.J., Gherbawy, Y., Thomsett, M.A., and 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.

Bottalico, A., and G. Perrone. 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.

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?

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., M. C. Hare, D. W. Parry, and S. G. Edwards. 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

Gourdain, E., Piraux, F., and Barrier-Guillot, B., 2009. Les outils pour gérer le risque déoxynivalénol sur blé tendre et blé dur. AFPP – 9ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 8 et 9 décembre 2009.

Gourdain E., Maumené C., Valade R., and 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., A. Belhadj, and M. Menez. 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.

Lemmens, M. 2007. Genetical, ecophysiological and biochemical interactions modulating the biogenesis of *Fusarium* mycotoxins. In *Colloque scientifique RARE* Arcachon, France, pp. 3-4.

Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J.D., and 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., and 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.

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.