



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt,
l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité

BIPE

CARACTERISATION DE LA DIVERSITE DES ESPECES DE
FUSARIUM ET DE LEUR POTENTIEL MYCOTOXINOGENE SUR
CEREALES FRANÇAISES

NICOLAS BALLOIS

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 05/09/2012

Maître de stage : Anne-Laure Boutigny, chargée de projets scientifiques et techniques

Tuteur universitaire : Christophe Robin, directeur de recherche INRA au Laboratoire Agronomie et Environnement

REMERCIEMENTS

La rédaction des remerciements est un exercice délicat et périlleux. Périlleux, car on a toutes les chances d'oublier de citer quelqu'un qui pourtant s'est investi pour nous et a donné de son temps. Périlleux car on n'est jamais sûr de savoir trouver les mots. Périlleux car l'on risque l'indigestion de bons sentiments. Périlleux, car les remerciements sont toujours écrits à trois minutes d'imprimer la version finale de notre mémoire et que la faute d'orthographe ou de syntaxe guette. Périlleux parce que l'anaphore n'est à la mode que depuis quelques mois.

Pourtant, il me faut exprimer la gratitude que je ressens pour les personnes qui m'ont formé, appuyé, épaulé, encadré et tout au long de ces six mois, aidé.

Merci donc à Anne-Laure pour m'avoir accepté comme stagiaire, pour ses conseils, son aide et sa patience et surtout pour m'avoir soutenu tout au long du stage. Ça a été un réel plaisir de travailler ainsi.

Merci à Renaud de m'avoir accueilli au sein de l'Unité, de m'avoir intégré ainsi dans l'équipe et pour son aide précieuse lors de l'analyse des données.

Merci à l'IFBM et à Arvalis pour nous avoir fourni les échantillons que nous avons traités.

Merci au Dr. Todd J. Ward et à son équipe d'avoir accepté de collaborer à ce projet en effectuant les analyses par MLGT des souches que nous lui avons envoyées.

Une pensée chaleureuse également pour Carole, Jacqueline, Véronique, Nathalie, Sylvie, Céline, Cécile, Isabelle, Anthony, Adélie et Marie. Les moments de travail et d'amitié que nous avons partagés sont une richesse.

Je pense aussi à mes parents qui savent aujourd'hui que *Fusarium* n'est pas le nom d'un méchant dans « Star Wars », et à Sébastien qui se passionnera bientôt pour d'autres champignons.

Enfin, que serais-je devenu sans l'appui de Camille, Midona et Mélusine ? Il y a toujours des moments de doute dans un tel projet, et ces êtres chers sont là pour me rassurer.

TABLE DES MATIERES

1- INTRODUCTION.....	6
1.1 LA FUSARIOSE.....	6
1.1.1. Généralités.....	6
1.1.2. Symptômes.....	6
1.2 LES CHAMPIGNONS DU GENRE <i>FUSARIUM</i>.....	7
1.2.1 Epidémiologie.....	7
1.2.2 Biologie des champignons du genre <i>Fusarium</i>	7
1.3 <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> (F.P. : <i>GIBBERELLA ZEA</i>)	9
1.3.1 Importance	9
1.3.2 Phylogénie	9
1.3.3. Origine géographique.....	10
1.4 LES MYCOTOXINES	11
1.4.1. Les trichothécènes.....	11
1.4.2. Les fumonisines	14
1.4.3. Autres mycotoxines	15
2- STRUCTURE D'ACCUEIL ET MISSION	15
2.1 PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACCUEIL.....	15
2.2 OBJECTIFS DU STAGE.....	16
3- MATERIEL ET METHODES.....	16
3.1 LES ECHANTILLONS	16
3.2 ISOLEMENT DES ESPECES DE <i>FUSARIUM</i>.....	17
3.2.1 Isolement et caractérisation des espèces de <i>Fusarium</i>	17
3.2.2. Monospores de <i>Fusarium graminearum</i> s.l.	18
3.2.3. Mise en collection	19
3.2.4. Extraction d'ADN	19
3.2.5. Séquençage	19
3.3 MGLT.....	19
4. RESULTATS	21
4.1. NIVEAU D'INFECTION DES ECHANTILLONS	21
4.2 DIVERSITE DES ESPECES DE <i>FUSARIUM</i>	22
4.2.1. Espèces de <i>Fusarium</i> majoritairement trouvées sur les plantes-hôtes	22
4.2.2. Répartition des espèces à l'échelle régionale.....	23
4.3 DIVERSITE DES ESPECES DU FGSC ET DE LEURS CHEMOTYPES.....	24
4.3.1 Diversité des espèces du FGSC	24
4.3.2. Diversité des chémotypes	24
5. DISCUSSION	25
5.1 DIVERSITE DU COMPLEXE FUSARIEN SUR BLE, ORGE ET MAÏS	25
5.1.1. Sur blé	25
5.1.2. Sur orge.....	25
5.1.3. Sur maïs	26
5.1.4. Les espèces du FGSC et leurs chémotypes	27
5.1.5. Changement climatique	27
5.2 EFFET DES PRATIQUES CULTURALES.....	27
CONCLUSION	28

6. PERSPECTIVES.....	28
6.1 ETUDE DU FGSC EN FRANCE	28
6.2 FUSARIUM TEMPERATUM.....	28
6.3 DIVERSITE DE F. POAE	28
 BIBLIOGRAPHIE	 30
ANNEXE 1.....	34
ANNEXE 2.....	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Symptômes de la fusariose des céréales	p.6
Figure 2 : Spores de <i>Fusarium graminearum</i>	p.7
Figure 3 : Importance des espèces de <i>Fusarium</i> sur céréales et leurs mycotoxines associées	p.7
Figure 4 : Cycle biologique de <i>Fusarium</i> (F.P. : <i>Gibberella</i>) sur céréales	p.8
Figure 5 : Micrographie de l'infection d'une cellule de l'épiderme du lemme par un hyphes de <i>Fusarium</i>	p.9
Figure 6 : Arbre phylogénétique représentant les 15 espèces du FGSC	p.10
Figure 7 : Structure générale des trichothécènes	p.11
Figure 8 : Molécule de DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV et fusarénone-X	p.12
Figure 9 : Effet inhibiteur de 20 ppm de DON appliqué sur des grains de blé et grains de blé traités avec de l'eau	p.13
Figure 10 : Molécule de Fumonisine B1	p.14
Figure 11 : Répartition des échantillons de grains utilisés pour l'étude	p.16
Figure 12 : Grains de maïs et d'orge sur DCPA après 8 jours à 22°C	p.17
Figure 13 : Morphologie d'espèces de <i>Fusarium</i> sur PDA	p.18
Figure 14 : Morphologie des conidies de <i>Fusarium</i> spp.	p.18
Figure 15 : Spores de <i>Fusarium graminearum</i> sur Water-Agar	p.18
Figure 16 : Schéma de principe du MLGT	p.20
Figure 17 : Pourcentage moyen de grains de maïs, de blé et d'orge infectés par <i>Fusarium</i> spp. en fonction de la région	p.21
Figure 18 : Diversité des espèces de <i>Fusarium</i> isolées de blé, d'orge et de maïs en 2011	p.22
Figure 19 : Espèces de <i>Fusarium</i> isolées de maïs en fonction de la région	p.23
Figure 20 : Espèces de <i>Fusarium</i> trouvées sur blé en fonction de la région	p.24
Figure 21 : Chémotype des souches de <i>Fusarium graminearum</i> s.s. isolées de blé, d'orge et de maïs	p.25
Figure 22 : Espèces de <i>Fusarium</i> trouvées sur orge en France en 2002	p.26

ABREVIATIONS

15-ADON : 15-acétyl-déoxynivalénol
3-ADON : 3-acétyl-déoxynivalénol
ADN : acide désoxyribonucléique
AFSSA : agence française de sécurité sanitaire des aliments
AFSSET : agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail
ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ASPE : *allele specific primer extension*
BLAST : *basic local alignment search tool*
BEA : beauvéricine
DAS : diacétoxyscirpénol
DCPA : *dichloran chloramphenicol peptone agar*
DJT : dose journalière tolérée
dNTP : désoxyribonucléotide
DON : déoxynivalénol
EF : facteur d'élongation
EILA : essais inter-laboratoires
ENN : enniantines
FB1 / FB2 : fumonisine B1 / B2
FGSC : *Fusarium graminearum species complex*
F.P. : forme parfaite
FUM : fumonisines
Fx : fusarénone-X
HR : humidité relative
IDM : inhibiteur de la déméthylation
IFBM : institut français de brasserie malterie
IPCC : *intergovernmental panel on climate change*
LSV : laboratoire de la santé des végétaux
LQ : limite de quantification
MAT : *mating type gene*
MLGT : *multilocus genotyping*
MON : moniliformine
NCBI : *national center for biotechnology information*
NIV : nivalénol
OCDE : organisation de coopération et de développement économique
OGM : organisme génétiquement modifié
PCR : *polymerase chain reaction*
PDA : *potato dextrose agar*
ppb : partie par billion
ppm : partie par million
PPP : produit phytopharmaceutique
QSP : quantité suffisante pour
RED : reductase
Resp. : respectivement
ROS : formes actives de l'oxygène
s.l. : *sensu lato*
SNA : *spezieller nährstoffarmer agar*
sp. : *species*
spp. : *species pluralis*
s.s. : *sensu stricto*
Taq : *Thermophilus aquaticus*
TCS : techniques culturales simplifiées
TCT : trichothécènes
ZEa : zéaralénone

1- INTRODUCTION

1.1. La fusariose

1.1.1. Généralités

La fusariose est une maladie des céréales dites "à petits grains" que l'on retrouve partout dans le monde (Parry *et al.*, 1995). De 1998 à 2000, les pertes dues à la fusariose ont pu être estimées à près de 2,7 milliards de dollars dans les états du centre et du nord des Etats-Unis (Gautam, 2011). L'importance économique de la fusariose est attribuée aux pertes de rendements considérables (avortement des fleurs, diminution du nombre et du poids des grains) et à l'altération de la qualité des grains (Pirgozliev *et al.*, 2003) ; ce qui a des conséquences néfastes lors des processus de transformations industrielles des grains.

En plus des pertes de production, certaines espèces de *Fusarium* présentent sur les céréales peuvent conduire à la contamination des grains par diverses mycotoxines. Ces métabolites secondaires produits par les champignons présentent une toxicité avérée vis-à-vis de nombreux organismes. Certaines espèces de *Fusarium* qui infectent les céréales peuvent produire une ou plusieurs mycotoxines. Parmi les fusariotoxines présentes sur céréales en Europe, les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone sont les plus rencontrées.

1.1.2. Symptômes

Lorsque les conditions climatiques sont favorables, la fusariose peut attaquer à tous les stades de développement et tous les organes de la plante, depuis les racines jusqu'aux épis. Le terme "fusariose" des céréales regroupe trois types de symptômes (Parry *et al.*, 1995) :

- "Seedling Blight" : fusariose des semences, provoquent des manques à la levée et des fontes des semis
- "Foot Rot" : fusariose du collet, entraînant la nécrose de ces tissus
- "Head Blight" : fusariose de l'épi

Notre travail concerne plus particulièrement la fusariose de l'épi.

La fusariose des épis de blé est caractérisée par le flétrissement des épis et une sénescence prématurée, les épis apparaissent alors blanchâtres (figure 1-A). Les grains de blé fusariés sont petits, légers, ridés et parfois couverts d'un duvet blanc ou rose (Figure 1-B). Si l'infection est plus tardive, les grains peuvent être de taille normale mais ils se décolorent en rose. Les symptômes observés sur orge sont semblables à ceux observés sur blé décrits plus haut (McMullen *et al.*, 2008).

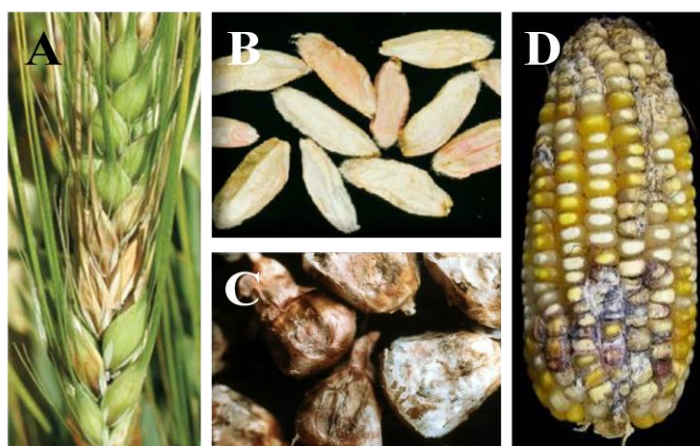


Figure 1 : Symptômes de la fusariose sur céréales : épis de blé avec des grains fusariés (A), grains de blés ridés et rosâtres (B), grains de maïs fusariés (C), épi de maïs fusariés (D) (McMullen *et al.*, 2008).

Sur le maïs, la fusariose se caractérise par la présence d'une pourriture grise à rose sur l'épi (Figure 1-D), ainsi que sur la tige et le collet. Les grains de maïs sont rabougris (Figure 1-C). En cas d'infection précoce, les grains sont de taille normale mais avec une décoloration rose.

1.2 Les champignons du genre *Fusarium*

1.2.1 Epidémiologie

La fusariose de l'épi peut être causée par une vingtaine d'espèces du genre *Fusarium* (Parry *et al.*, 1995). Le nom donné à *Fusarium* est relié à l'allure fusiforme de ses spores (figure 2).

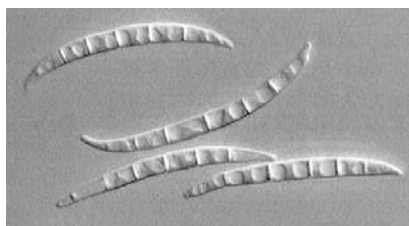


Figure 2 : Spore de *Fusarium graminearum* (Leslie *et al.*, 2006)

La distribution et la prédominance de ces espèces pathogènes sont déterminées par la plante-hôte, la région et les conditions climatiques (Xu, 2003). L'analyse de la bibliographie de ces dernières années permet la représentation schématique (figure 3) de la flore fusarienne sur blé, orge et maïs en Europe ainsi que les mycotoxines associées à ces espèces (Bottalico et Perrone, 2002 ; Ioos *et al.*, 2004 ; Schollenberger *et al.*, 2007 ; Parikka *et al.*, 2012 ; Scaufaire *et al.*, 2012)..

BLÉ	
ESPÈCE	TOXINE
<i>F. graminearum</i>	TCT B, ZEA
<i>F. avenaceum</i>	MON, BEA, ENN
<i>F. poae</i>	TCT B (NIV)
<i>F. culmorum</i>	TCT B, ZEA
<i>F. tricinctum</i>	MON, BEA (TCT A)
<i>F. sambicum</i>	TCT A, ZEA, BEA
<i>F. sporotrichioides</i>	TCT A
<i>F. equiseti</i>	TCT A et B, ZEA
<i>F. acuminatum</i>	TCT A
<i>F. crookwellense</i>	TCT B, ZEA
<i>F. pseudograminearum</i>	TCT B
<i>F. heterosporum</i>	ZEA
<i>F. oxysporum</i>	FUM
<i>F. verticillioides</i>	FUM
<i>F. subglutinans</i>	MON, BEA, FUM
<i>F. langsethiae</i>	TCT A

ORGE	
ESPÈCE	TOXINE
<i>F. avenaceum</i>	MON, BEA, ENN
<i>F. graminearum</i>	TCT B, ZEA
<i>F. poae</i>	TCT B (NIV)
<i>F. culmorum</i>	TCT B, ZEA
<i>F. tricinctum</i>	MON, BEA (TCT A)
<i>F. sporotrichioides</i>	TCT A
<i>F. equiseti</i>	TCT A et B, ZEA
<i>F. heterosporum</i>	ZEA

MAÏS	
ESPÈCE	TOXINE
<i>F. graminearum</i>	TCT B, ZEA
<i>F. verticillioides</i>	FUM
<i>F. proliferatum</i>	FUM
<i>F. subglutinans</i>	MON, BEA, FUM
<i>F. culmorum</i>	MON, TCT B et A,
<i>F. crookwellense</i>	TCT B, ZEA
<i>F. avenaceum</i>	MON, BEA, ENN
<i>F. acuminatum</i>	MON, ENN
<i>F. equiseti</i>	TCT A et B, ZEA
<i>F. compactum</i>	TCT A, ENN
<i>F. oxysporum</i>	FUM

Figure 3 : Importance des espèces de *Fusarium* sur céréales et leurs mycotoxines associées

(TCT : trichothécène, ZEA : zéaralénone, MON : moniliformine,

BEA : beauvericine, ENN : enniantine, FUM : fumonisine)

Les espèces figurant en marron sur la figure X représentent les espèces majoritaires sur la plante-hôte, celles en orange sont de moindre importance, celles en jaune sont peu présentes.

1.2.2 Biologie des champignons du genre *Fusarium*

1.2.2.1 Cycle biologique

L'infection d'une plante par *Fusarium* peut avoir plusieurs origines : (i) une origine biotique dans le cas d'un oiseau ou d'un insecte (*Sitodiplosis mosellana* notamment, Mongrain *et al.*, 2000) qui transporterait des spores et les dissémineraient dans la nature ou (ii) une origine abiotique lorsque c'est le vent ou la pluie qui permet la dissémination des spores dans la nature.

La fusariose est considérée comme une maladie polycyclique, mais l'inoculum primaire est la source principale d'inoculum pour l'apparition de la maladie (Trail, 2009). Cet inoculum primaire se trouve sur les résidus de culture antérieure infectés qui permettent, après la récolte, le développement de périthèces et donc d'ascospores. Les périthèces permettent au champignon de passer l'hiver sous cette forme de conservation. Lorsque des conditions favorables à l'ouverture du périthèce sont réunies, c'est-à-dire obscurité et humidité suffisante, les ascospores se diffusent dans l'air ce qui permet la colonisation des fleurs, de la tige voire des grains par ces ascospores (figure 4). Le champignon est alors sous sa forme sexuée, *Gibberella*. Par la suite, les ascospores vont germer si l'humidité relative (HR) est supérieure à 85% et la température avoisine les 25-30°C. L'infection peut intervenir à différents stades de développement de la plante-hôte puisque la pénétration du champignon se fait par les zones dites sensibles, c'est-à-dire des ouvertures de tissus dues à la sénescence, par les anthères après la floraison, ou encore par le péricarpe, le champignon progressant entre lemme et palea (Kang et Buchenauer, 2002).

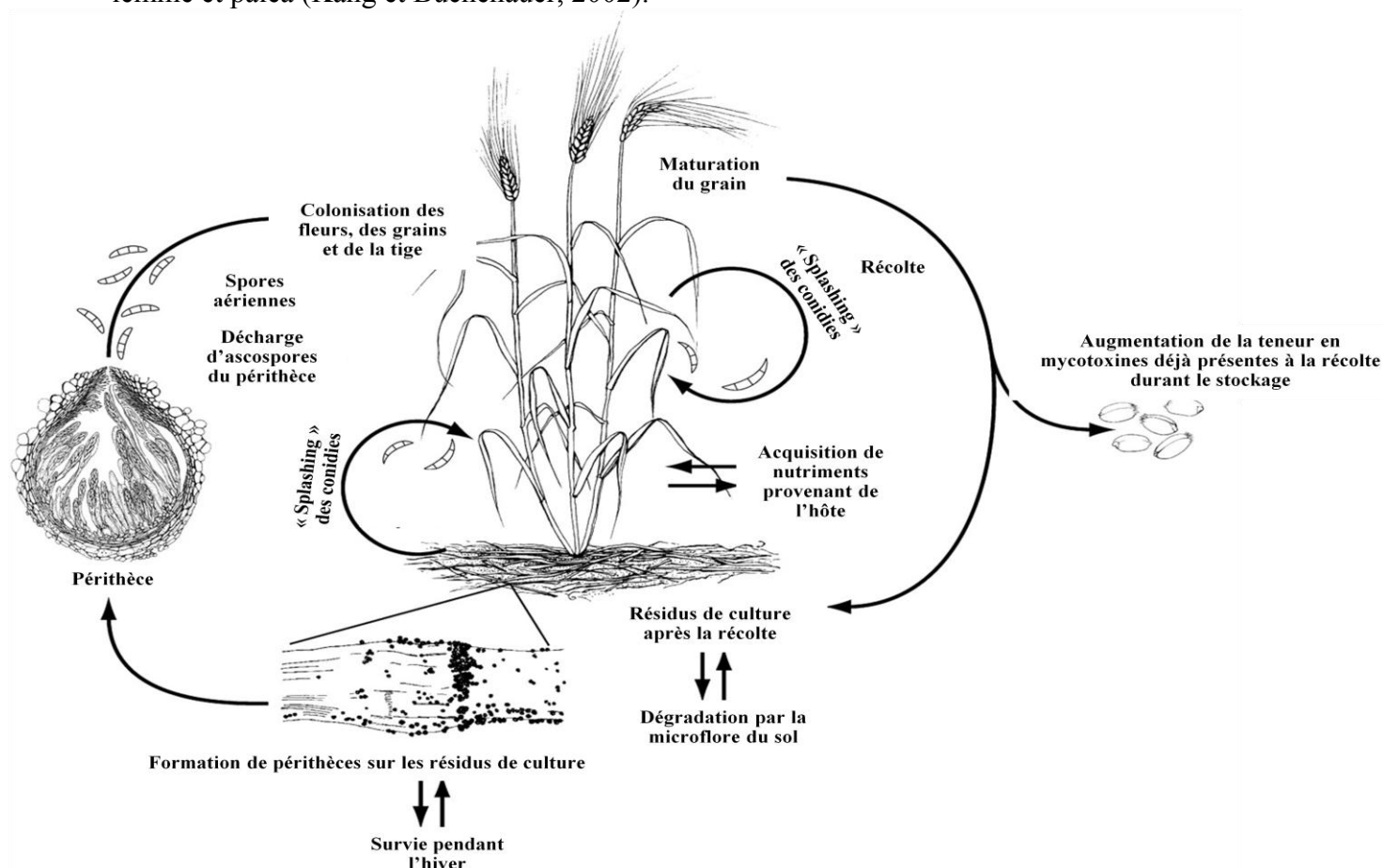


Figure 4 : Cycle biologique de *Fusarium* (F.P. : *Gibberella*) sur céréales (Trail, 2009)

Le champignon colonise ainsi la plante-hôte de l'épi à la tige. Certains grains infectés tombent au sol pendant la récolte formant une nouvelle source d'inoculum. Le champignon est alors sous la forme asexuée, *Fusarium*. Des conidies se trouvent ainsi au niveau du sol et en cas de chute de gouttes d'eau, ces conidies sont disséminées par phénomène de « *splashing* » (figure 4). D'autre part, quand le champignon se trouve au sol, il produit des chlamydospores, une forme asexuée de spores à paroi épaisse lui permettant de passer l'hiver.

1.2.2.2 L'infection

La spore qui se trouve sur la plante hôte germe en produisant un mycélium. Les hyphes qui forment le mycélium parviennent à pénétrer dans la plante, c'est-à-dire à l'infecter, par des ouvertures naturelles ou des blessures à la surface de la plante. Lorsque le

champignon s'est introduit dans un tissu, celui-ci progresse d'abord de manière intercellulaire, c'est la phase asymptomatique de la maladie. Le champignon rejoint les vaisseaux conducteurs du xylème et se développe ainsi dans la moelle de la tige. Cela permet au champignon de se développer dans l'ensemble de la plante. C'est le début de la phase symptomatique avec formation de nécroses sur la tige et décoloration des tissus. L'hyphe pénètre dans les cellules de l'hôte (Figure 5) en traversant la paroi.

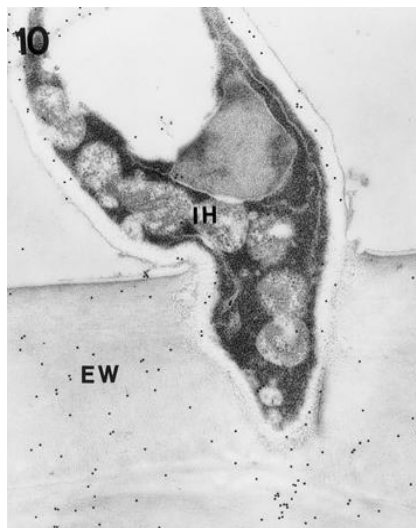


Figure 5 : Micrographie de l'infection d'une cellule de l'épiderme du lemme par un hyphé de *Fusarium culmorum* (Kang et Buchenauer, 2002).

EW : Paroi de la cellule de l'épiderme : IH : Hyphe du parasite

1.3 *Fusarium graminearum* (F.P. : *Gibberella zeae*)

1.3.1 Importance

En 2012, la revue scientifique *Molecular Plant Pathology* (Dean *et al.*, 2012) établit un classement des champignons phytopathogènes d'importance économique. *F. graminearum* est classé quatrième champignon phytopathogène majeur mondial. Ce résultat s'explique par la prédominance et le potentiel mycotoxinogène de *F. graminearum* qui provoque outre des baisses de rendement, des baisses de la qualité du grain et des produits transformés issus de ce grain. En effet, les grains sont rabougris et contaminés par des mycotoxines (Osborne et Stein, 2007). Cette espèce est aujourd'hui majoritaire sur le blé et l'orge dans la plupart des pays européens et en Amérique du Nord (Parikka *et al.*, 2012).

1.3.2 Phylogénie

Depuis les années 2000, des études phylogénétiques menées sur l'espèce *F. graminearum* en utilisant des outils moléculaires et de séquençage ont permis de diviser l'espèce *F. graminearum* en un complexe de 15 espèces (figure 6), on parle du complexe d'espèce de *Fusarium graminearum* (FGSC = *Fusarium graminearum* species complex) (O'Donnell *et al.*, 2000 ; Ward *et al.*, 2002 ; O'Donnell *et al.*, 2004 ; Starkey *et al.*, 2007 ; O'Donnell *et al.*, 2008 ; Yli-Mattila *et al.*, 2009 ; Sarver *et al.*, 2011). Ces espèces ne peuvent pas être distinguées morphologiquement et leur potentiel toxinogène ainsi que leur distribution géographique diffèrent.

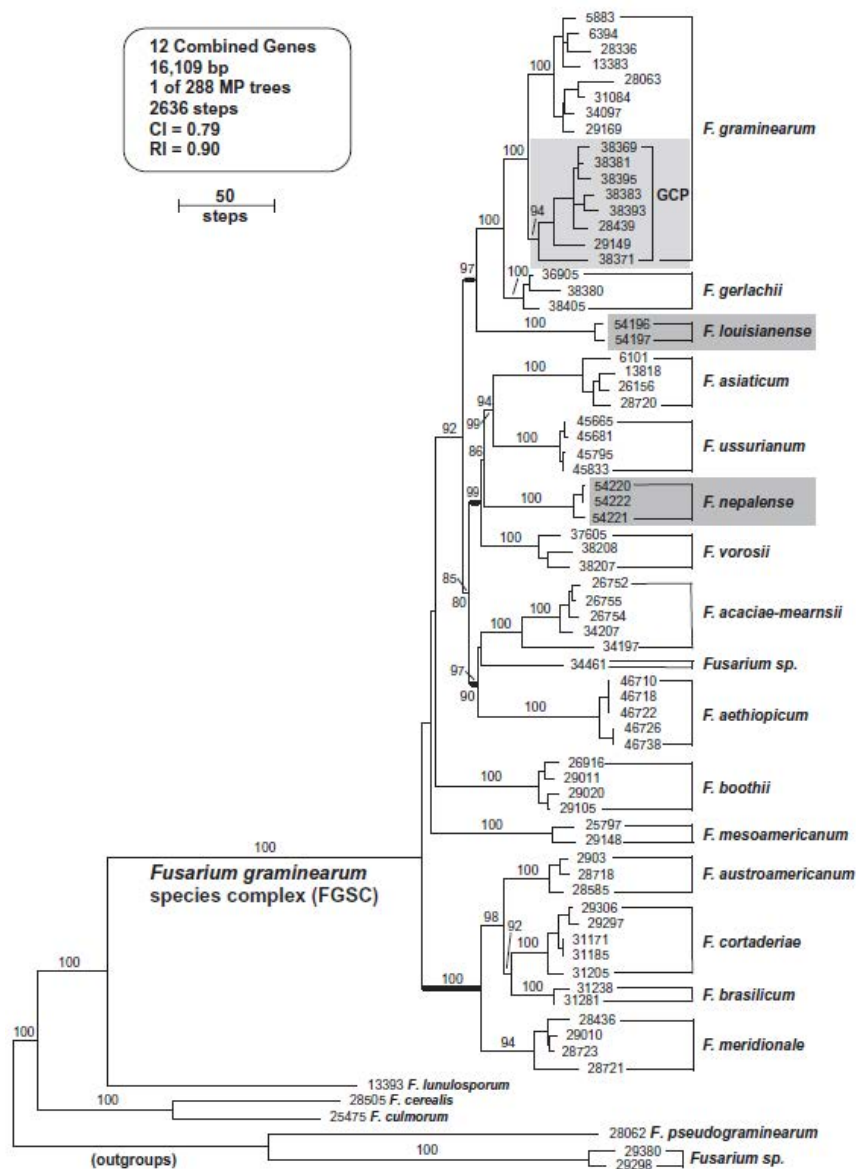


Figure 6 : Arbre phylogénétique représentant les 15 espèces du complexe FGSC (Sarver *et al.*, 2011)

De plus, l'agressivité des différents espèces du FGSC diffère et semblerait en partie corrélée aux mycotoxines produites par la souche (Carter *et al.*, 2002). Une étude menée en 2012 montre que *F. graminearum* sensu stricto (s.s.) est plus agressive que *F. boothii* sur blé (Malhi pour *et al.*, 2012).

1.3.3. Origine géographique

Des données biogéographiques suggèrent que *F. graminearum* sensu lato (s.l.) seraient originaires de l'hémisphère Sud et de l'Asie (Wang *et al.*, 2011). Les échanges commerciaux, la mondialisation et le changement climatique auraient permis la réémergence de la fusariose dans les régions de l'hémisphère Nord comme en Europe ou en Amérique du Nord et l'apparition de cette maladie dans des régions jusqu'alors préservées comme l'Océanie (Starkey *et al.*, 2007 ; O'Donnell *et al.*, 2004).

Certaines espèces du FGSC semblent cosmopolites, comme par exemple *F. graminearum* s.s. retrouvée en Asie, en Europe, en Afrique, en Amérique du Nord et du Sud et en Océanie. A l'inverse, certaines espèces du FGSC semblent endémiques. *F. acaciae-mearnsii* serait endémique de l'Australie (O'Donnell *et al.*, 2004), *F. asiaticum*, *F. ussuriense*

et *F. vorosii* seraient endémiques de l'Asie (O'Donnell *et al.*, 2004), *F. austroamericanum*, *F. meridionale*, *F. brasiliicum* et *F. cortaderiae* seraient endémiques de l'Amérique du Sud (Sampietro *et al.*, 2011) et enfin *F. mesoamericanum* et *F. gerlachii* seraient respectivement endémiques d'Amérique centrale et des Etats-Unis (O'Donnell *et al.*, 2004).

La répartition géographique des espèces du FGSC, tout comme celle des espèces de *Fusarium* est influencée par les conditions climatiques, température, humidité, durée et intensité d'ensoleillement, pression atmosphérique. Les résultats de la littérature suggèrent que *F. graminearum* s.s. est plus largement observé dans des régions tempérées dont la température annuelle moyenne est de 15°C ou moins. Au contraire, *F. asiaticum* est plutôt observé dans des régions chaudes (Zhang *et al.*, 2007). En Allemagne, une étude montre que 64,9% des 521 souches de *Fusarium* spp. isolées de blé sont *F. graminearum* s.s. (Talas *et al.*, 2011).

1.4 Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des molécules aux structures chimiques très variées. Ce sont des métabolites secondaires synthétisés par des champignons filamenteux parmi lesquels les genres principaux sont *Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Claviceps* (Steyn, 1995). Les espèces de *Fusarium* produisent différents types de mycotoxines parmi lesquelles les plus fréquentes sont les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone (Placinta *et al.*, 1999). Ces mycotoxines sont connues pour être produites au champ, mais également lors du stockage du grain si de l'eau est disponible (Langseth *et al.*, 1997).

1.4.1. Les trichothécènes

Les trichothécènes constituent le groupe de mycotoxines produites par *Fusarium* le plus important avec près de 150 trichothécènes isolés chimiquement. Toutefois, seuls les trichothécènes de type A et B semblent avoir une réelle importance sur les cultures de céréales (Smith *et al.*, 1994). Les espèces produisant des trichothécènes, comme *F. graminearum* s.l. sont très cosmopolites, ce qui explique l'importance de ces mycotoxines à l'échelle mondiale. Il existe une différence géographique pour la répartition des mycotoxines produites par *Fusarium*. Par exemple, on retrouve davantage de trichothécènes de type B en Europe et en Amérique du Nord que de trichothécènes de type A (Fink et Gremmels, 1999).

Les principales mycotoxines produites par le genre *Fusarium* et en particulier le complexe d'espèces *Fusarium graminearum* sont les trichothécènes B, notamment le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV) et leurs dérivés acétylés (Ward *et al.*, 2008).

1.4.1.1 Propriétés chimiques et physiques des trichothécènes

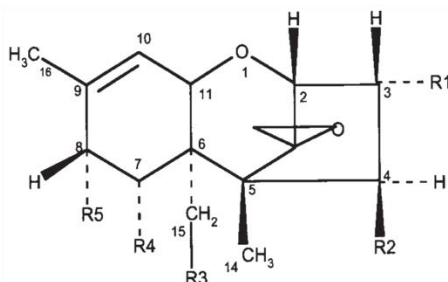


Figure 7 : Structure générale des trichothécènes

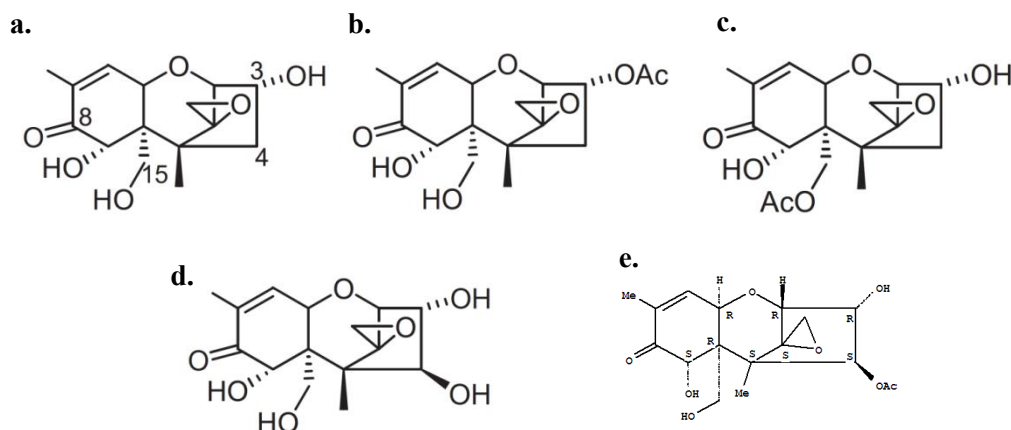
Les trichothécènes (12,13-époxytrichothéc-9-ènes) sont des sesquiterpènes tricycliques caractérisés par une double liaison en C-9,10, un groupement carbonyle en C-8 et une fonction époxyde en C-12,13 qui confèrent à la molécule sa toxicité (figure 7)

1.4.1.2 Identification de chémotypes

Il a été possible d'identifier sur des bases génétiques trois chémotypes caractérisant les trichothécènes de type B produits par une souche de *Fusarium* (Desjardins, 2006) :

- **3-ADON** : Souches produisant du DON (figure 8a) et du 3-ADON (figure 8b)
- **15-ADON** : Souches produisant du DON et du 15-ADON (figure 8c)
- **NIV** : Souche produisant du NIV (figure 8d) et de la fusarénone X (figure 8e)

Les différentes espèces de *Fusarium* ne possèdent pas tous le même chémotype (Alexander *et al.*, 2011). De plus, deux isolats d'une même espèce de *Fusarium* ne synthétisent pas nécessairement non plus les mêmes trichothécènes B (Talas *et al.*, 2011).



Figures 8 : Molécule de DON (a), 3-ADON (b), 15-ADON (c), NIV (d) et fusarénone-X (e)

F. poae est considérée comme l'espèce principale productrice de NIV dans les pays du nord de l'Europe tandis que *F. graminearum* s.l. est considérée comme une espèce produisant majoritairement du DON (Bottalico et Perrone, 2002). Certaines souches de *F. graminearum* s.l. sont productrices de NIV. Les trois chémotypes sont présents chez *Fusarium graminearum* s.s. et *F. asiaticum*. Seuls les chémotypes 3-ADON et NIV ont été observé pour *F. acaciae-mearnsii*, *F. mesoamericanum*, *F. austroamericanum*, *F. cortaderiae* et *F. brasiliicum*. Enfin, seul le chémotype 3-ADON a été observé pour *F. ussurianum*, seul le chémotype 15-ADON a été observé pour *F. boothii*, *F. vorosii* et *F. aethiopicum* et seul le chémotype NIV a été observé pour *F. meridionale* et *F. gerlachii* (Wang *et al.*, 2011).

1.4.1.3 Voie de biosynthèse des trichothécènes B

La biosynthèse des trichothécènes chez *Fusarium* est codée par un cluster de 15 gènes *Tri*. Ces gènes sont répartis en 3 loci sur différents chromosomes. Le premier locus est un ensemble de 12 gènes ; le second loci contient les gènes *Tri1* et *Tri16* ; le troisième est formé par le gène *Tri101* (Alexander *et al.*, 2011). Cette biosynthèse s'intègre dans la voie de biosynthèse des stéroïdes. En effet, le précurseur aux réactions conduisant à la biosynthèse des trichothécène est le farnésyl-pyrophosphate (FPP).

La synthèse de trichothécènes est influencée par des facteurs exogènes tels que la température, pH, pression atmosphérique, lumière, les nutriments disponibles... Ces facteurs influencent l'expression des gènes *Tri6* et *Tri10*, identifiés comme les gènes régulateurs de la biosynthèse des trichothécènes (Seong *et al.*, 2009).

La différence génétique entre le chémotype 3-ADON et le chémotype 15-ADON viendrait du gène *Tri8* (Alexander *et al.*, 2011). Le gène code une enzyme estérase, qui dans le cas du chémotype 3-ADON catalyse la déacétylation du C-15 de l'intermédiaire 3,15-diacetyldeoxynivalénol (figure X) et dans le cas du chémotype 15-ADON catalyse cette même réaction mais en C-3. De même, la possibilité pour une souche de produire du NIV serait corrélée aux gènes *Tri 7* et *Tri 13* qui seraient fonctionnels pour le chémotype NIV et pas pour le chémotype DON (Lee *et al.*, 2002)

1.4.1.4 Relation plante-hôte

Le DON inhibe la germination du blé comme le montre la figure 9 avec un témoin traité à 20ppm de DON (A) et un témoin traité avec de l'eau (B) (Rocha *et al.*, 2005). Ce phénomène s'expliquerait par l'action inhibitrice du DON sur l'activité du facteur d'élongation EF-1 α impliqué dans la croissance cellulaire.

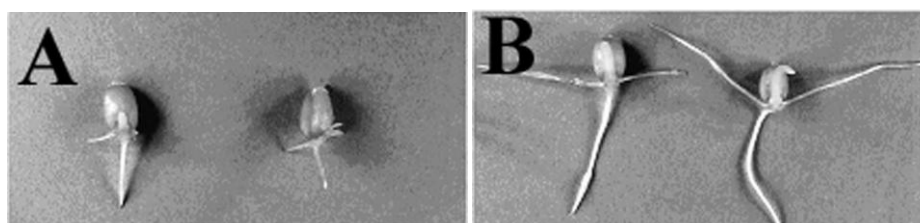


Figure 9 : Effet inhibiteur de 20ppm de DON (A) appliqué sur des grains de blé (cv. Avalon) et grains de blés traités avec de l'eau (B) (Rocha *et al.*, 2005)

Parmi les nombreux effets cellulaires des trichothécènes, et en particulier des trichothécènes B, citons l'inhibition des synthèses protéiques qui a lieu dans les grains et les gaines foliaires de blé ainsi que dans les grains de maïs. Ces mycotoxines interfèrent avec le site actif de la peptidyl-transférase des ribosomes, ce qui inhibe l'initiation, l'élongation ou la terminaison des synthèses protéiques (Rocha *et al.*, 2005).

Lors de l'infection d'une plante hôte par un parasite, la plante met en place des mécanismes de défense comme l'émission de formes actives de l'oxygène (ROS) créant un environnement oxydant qui induit une l'expression de gènes *Tri* et donc la production de DON ou de NIV (Pont *et al.*, 2007).

1.4.1.5. Les trichothécènes dans les produits transformés

En 2006, la Commission Européenne instaure des limites de teneurs en DON dans le grain non transformé imposant 1250 ppb pour les grains destinés à la consommation humaine, et 900 ppb pour ceux destinés à l'alimentation du bétail (Verstraete, 2006). Le rapport final de l'AFSSA (2009) conclut que le consommateur français est exposé à des doses de DON et de NIV inférieures aux DJT (Doses Journalières Tolérées). Toutefois, ces DJT ont été définies d'après des études subchroniques faites sur des modèles animaux. L'OCDE requiert des données toxicologiques plus précises afin d'affiner ces seuils.

Lors du processus de fabrication de la bière, le maltage consiste à recréer artificiellement dans un cadre industriel les conditions favorables à la germination des grains

Il est possible de diminuer la teneur de produits en trichothécènes de 50%, notamment par cuisson à l'eau des pâtes, les trichothécènes étant solubles dans l'eau (Kimura *et al.*, 2006).

L'effet toxique du DON a été mis en évidence pour la première fois en 1972 au Japon chez les consommateurs de bière atteints de vomissements (Ueno *et al.*, 1983), ce qui vaut au DON le nom de « vomitoxine ». D'autres symptômes ont toutefois été observés parmi lesquels des diarrhées, des douleurs abdominales, maux de tête, sensation de vertiges, fièvre, syndromes dépressifs et anorexie (Sobrova *et al.*, 2010). De manière plus générale, les trichothécènes ont des effets immunotoxiques, neurotoxiques voire carcinogènes.

1.4.2. Les fumonisines

CCCC[C@H](C(=O)OCC(=O)O)[C@@H](C(=O)OCC(=O)O)[C@H](O)CCCC[C@H](O)CC[C@H](O)CN

Les fumonisines sont des analogues structuraux de la sphinganine et de la sphingosine, précurseurs des sphingolipides constituants majeurs des membranes plasmiques des cellules nerveuses et du cerveau notamment. Les fumosinines inhibent la synthèse de ces lipides membranaires par inhibition de la céramide synthase chez la plante-hôte. Toutefois, la biosynthèse des fumonisines par le champignon s'intègre à la voie de biosynthèse des sphingolipides.

14

fumonisines de *F. verticillioides* et *F. proliferatum* retrouvées dans les aliments, il s'agit de la leucoencéphalomalacie.

La population française est peu exposée aux fumonisines en raison de la faible consommation de maïs. Une recommandation (2006/576/CE) européenne existe pour la teneur en fumonisines des aliments destinés aux Hommes, mais pas pour les aliments destinés au bétail (Rapport Final de l'Afssa, 2009).

1.4.3. Autres mycotoxines

La figure X montre que d'autres mycotoxines sont produites par les souches majoritairement trouvées sur les céréales. Il s'agit notamment de la zéaralénone (ZEA) produite par *F. graminearum*, *F. culmorum* ou encore *F. equiseti*. La ZEA est une mycotoxine à effet oestrogénique qui provoque des perturbations endocriniennes à la puberté (Rapport Final de l'Afssa, 2009). Cependant l'exposition de la population française à la ZEA reste modeste et atteint 31% de la DJT chez les végétaliens.

Enfin, les enniantines, produites notamment par *F. avenaceum* sont des molécules ionophores inhibitrices d'enzymes comme la cholestérol-acétyltransférase chez l'Homme (Meca *et al.*, 2010), la furasine C, produite par *F. tricinctum*, agit comme un agoniste oestrogénique responsable du cancer du sein (Sondergaard *et al.*, 2011), la moniliformine, produite par *F. subglutinans*, *F. tricinctum* et *F. avenaceum*, altère le cartilage chez l'Homme (Zhang *et al.*, 2010) et la beauvericine a une cytotoxicité proche de celle des enniantines et de la moniliformine (Stenglein, 2009).

2- STRUCTURE D'ACCUEIL ET MISSION

2.1. Présentation de la structure d'accueil

La structure qui m'a accueilli est un laboratoire de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), ex-AFSSA. Il fait partie du Laboratoire de la Santé des Végétaux (LSV) qui sont des laboratoires de référence et de recherche. Chacun des laboratoires composant le LSV est spécialisé dans une discipline : OGM, virologie, nématologie, bactériologie ou encore mycologie. L'Unité de Mycologie du LSV est implantée à Malzéville (54) et est dirigée par Renaud IOOS.

L'ANSES, créée au 1^{er} Juillet 2010, est issu de la fusion de l'AFSSA et de l'AFSSET. Le champ d'activité de l'agence est large et englobe aussi bien l'autorisation de mise sur le marché de produits phytopharmaceutiques (PPP) et des médicaments vétérinaires, que l'organisation de comités d'expertise indépendants, la prévention d'épidémies ou encore la mise au point de protocoles de référence. Plus généralement, elle contribue à « assurer la sécurité sanitaire humaine dans les domaines de l'environnement, du travail et de la consommation » (www.anses.fr, consulté le 02/07/2012).

Au sein de l'Unité de Mycologie du LSV, plusieurs activités sont exercées. Le laboratoire met au point des protocoles de référence pour la détection et l'identification de champignons parasites de grandes cultures, de cultures maraîchères, ornementales ou forestières. D'autre part, il est régulièrement sollicité pour le diagnostic de champignons présents sur ce type de culture. Il forme également d'autres laboratoires aux protocoles qu'il publie et organise des Essais Inter-Laboratoires (EILA) de validation des aptitudes à l'échelle

nationale et européenne. Enfin, le laboratoire a une activité de recherche, notamment sur les *Fusarium* et leur potentiel mycotoxinogène, menée par Anne-Laure BOUTIGNY.

Dix personnes travaillent au laboratoire : un chef d'unité, une chargée de projets scientifiques et techniques, une responsable sécurité et qualité, trois ingénieurs chargés de diagnostic et de mise au point de protocoles, trois techniciennes de laboratoire et une secrétaire.

2.2. Objectifs du stage

Fusarium est un pathogène de grande importance en Europe et notamment en France puisqu'il est responsable de pertes de rendements et produit des mycotoxines. Dans ce contexte, les objectifs de mon stage étaient de :

- Caractériser la flore fusarienne présente sur blé, orge et maïs en France
- Caractériser la diversité du FGSC et des chémotypes sur céréales françaises
- Analyser les données obtenues afin d'obtenir un profil d'espèces de *Fusarium* et de leur potentiel mycotoxinogène présents sur le territoire français en fonction de la plante-hôte. Les données seront ensuite replacées dans un contexte européen et mondial.

L'analyse de la flore fusarienne sur blé et orge permettra de faire une comparaison avec une étude similaire menée en 2002 (Ioos *et al.*, 2004) afin de mettre en évidence l'émergence ou la disparition de certaines espèces. En ce qui concerne le maïs, aucune étude n'a été publiée concernant la diversité de la flore fusarienne sur maïs en France. Nos résultats constitueront donc un état des lieux de la diversité de la flore fusarienne sur maïs en France.

De nombreuses études sont menées de par le monde pour la caractérisation de la diversité des espèces du FGSC et des chémotypes, mais aucune étude n'a encore été menée en France. Nos résultats constitueront donc également un premier état des lieux de la diversité des espèces du FGSC et chémotypes associés sur céréales françaises.

Ainsi, la connaissance de l'épidémiologie des espèces de *Fusarium* présentes en France permettra d'optimiser les moyens de lutte (utilisation de PPP, création variétale) afin de prévenir la contamination en mycotoxines des produits finis.

3- MATERIEL ET METHODES

3.1. Les échantillons

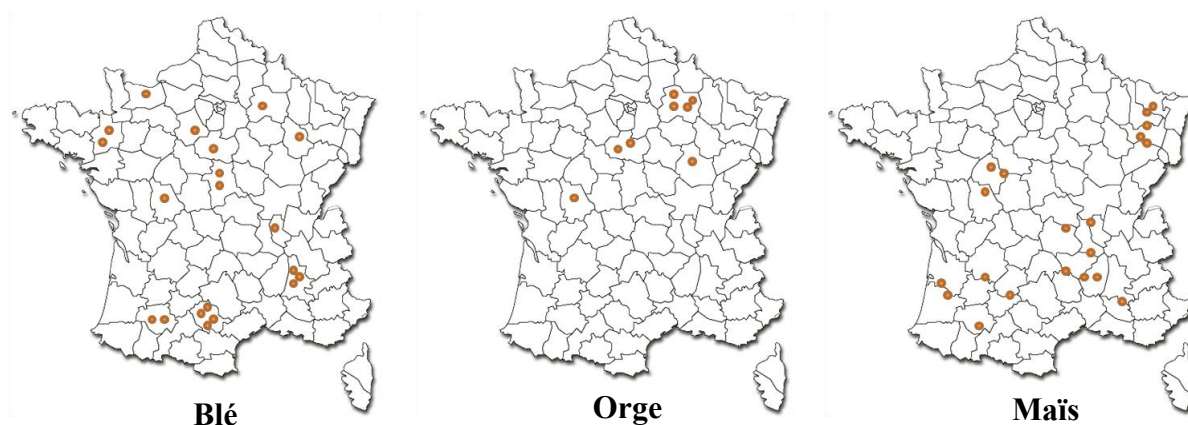


Figure 11 : Répartition des échantillons de grains utilisés pour l'étude

Les échantillons de blé, d'orge et de maïs ont été fournis par Arvalis, l'Institut du Végétal. Vingt échantillons de grains de blé, 20 échantillons de grains de maïs et 8 échantillons de grains d'orge collectés dans toute la France (figure 11) étaient disponibles pour l'étude. Ces échantillons proviennent de la récolte 2011 et étaient stockés à 5°C au laboratoire avant analyse.

3.2. Isolement des espèces de *Fusarium*

3.2.1 Isolement et caractérisation des espèces de *Fusarium*

La démarche suivie pour cette étude est décrite dans la méthode « Toutes céréales, Détection et Identification des Espèces de *Fusarium spp.* et *Microdochium nivale* sur grains de céréales par isolement mycologique semi-sélectif et étude microbiologique », Réf. MH.03-16 : version B inscrite dans la Directive Générale Mycologie, disponible au laboratoire.

Le sachet de grain est d'abord secoué afin de mélanger les grains de manière aléatoire. Puis il est ouvert sous une hotte à flux laminaire. Cinquante millilitres (mesuré dans une éprouvette graduée) de grains sont désinfectés à l'hypochlorite de sodium (1,5%Cl) pendant 10 minutes. Les grains sont ensuite séchés sur papier filtre stérile sous la hotte avant de déposer aléatoirement 100 grains sur des boîtes de Dichloran Chloramphenicol Peptone Agar (DCPA) à raison de 4 à 5 grains par boîte. La composition du milieu DCPA figure en **Annexe 1**.

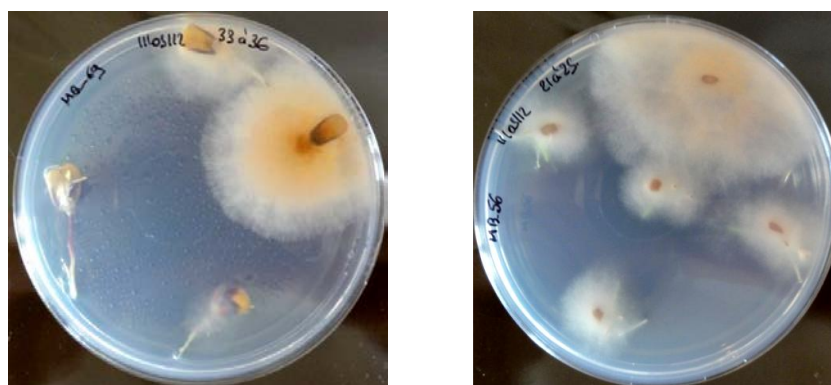


Figure 12 : Grains de maïs (gauche) et d'orge (droite) sur DCPA après 8 jours à 22°C

Le DCPA est un milieu inventé dans les années 1980 d'abord considéré comme un milieu sélectif au genre *Fusarium* (Andrews et Pitt, 1986) mais sélectionne en fait également des Hyphomycètes dématiés proches du genre *Fusarium* comme *Microdochium nivale* ou *Epicoccum*. Toutefois, il est possible de reconnaître une souche de *Fusarium* se développant sur DCPA de par la vitesse de croissance rapide, l'aspect du mycélium aérien cotonneux et parfois de couleur rose à orange comme représenté sur la figure 12.

Les boîtes de DCPA sont placées en culture à 22°C pendant 8 jours avant repiquage sur Potato Dextrose Agar¹ (PDA) dont la composition figure en **Annexe 1**, et *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) des souches de *Fusarium*. Le PDA est un milieu nutritif classiquement utilisé pour la culture de champignons microscopiques. Le SNA (Gerlach et Nirenberg, 1982) est un milieu minéral composé de sels minéraux, de glucose et de saccharose dont la composition figure en **Annexe 1**. Ce milieu pauvre en nutriments favorise le champignon mis en culture à former des fructifications comme les conidies qui sont des structures de conservation. Ces fructifications permettent l'identification morphologique de l'espèce de *Fusarium*.

¹ Milieu composé d'amidon de pomme de terre, de dextrose et d'Agar

Les boîtes de PDA et SNA sont mises en culture à 22°C pendant 7-10 jours avant de pouvoir être identifiées. On note la couleur des boîtes de PDA, ainsi que la vitesse de croissance, l'aspect et la couleur du mycélium aérien (figure 13) et éventuellement l'odeur. Cette première approche oriente l'identification de l'espèce.

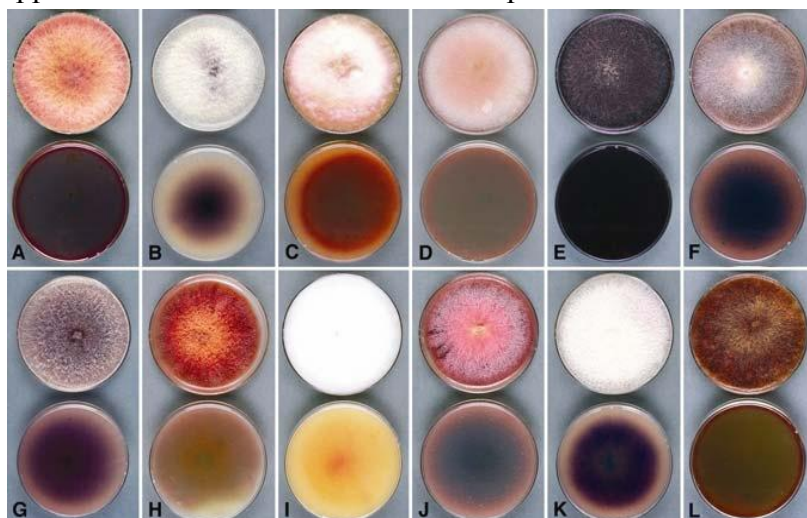


Figure 13 : Morphologie d'espèces de *Fusarium* sur PDA (Sumerell *et al.*, 2003)

(La boîte du haut de chaque paire correspond au mycélium aérien, celle du bas à la vue de dessous)

A, *F. poae*. B, *F. oxysporum*. C, *F. acuminatum*. D, *F. nelsonii*. E, *F. subglutinans*. F, *F. nygamai*. G, *F. pseudonygamai*. H, *F. lateritium*. I, *F. thapsinum*. J, *F. decemcellulare*. K, *F. verticillioides*. L, *F. culmorum*.

Les boîtes de SNA sont utilisées pour faire des lames de mycélium colorées au Bleu de Méthyle, ce qui permet l'observation des conidies. La morphologie des macroconidies et/ou des microconidies sont relativement spécifiques de l'espèce (figure 14).

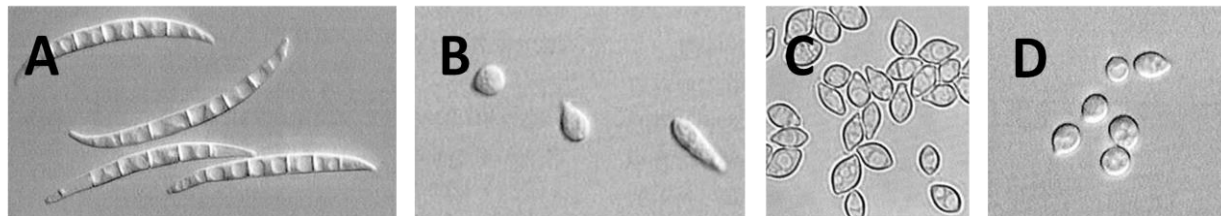


Figure 14 : Morphologie de conidies de *Fusarium* spp. (Leslie *et al.*, 2006)

(Macroconidies de *F. graminearum* (A) et microconidies de *F. sporotrichioides* (B), *F. tricinctum* (C) et *F. poae* (D))

3.2.2. Monospores de *Fusarium graminearum* s.l.

Pour chaque souche préalablement identifiée comme *F. graminearum*, un cube de gélose provenant de la boîte de SNA est placé dans un tube contenant 10 mL d'eau stérile et agité afin de mettre en suspension les spores. La suspension est versée sur du Water-Agar (Agar à 2%), ce qui permet la sédimentation des spores dans la gélose. L'excès d'eau est éliminé. Après une nuit à l'étuve à 22°C, les spores ont commencé à germer.



Figure 15 : Spores de *F. graminearum* sur Water-Agar

On observe alors la boîte de Water-Agar sous une loupe binoculaire (figure 15), et à l'aide d'un scalpel on prélève stérilement une spore que l'on dépose sur une boîte de PDA. 3 spores de chaque souche sont ainsi placées sur une boîte de PDA. Les souches monosporées assurent la pureté de l'échantillon. Après 3 jours, un repiquage est effectué sur une nouvelle boîte de PDA qui est alors placée à l'étuve pendant 7-10 jours.

3.2.3. Mise en collection

Afin d'assurer la viabilité des souches mises en collection, plusieurs procédés sont utilisés. Huit cubes de gélose PDA de chaque souche sont placés dans des microtubes contenant 1 mL d'huile stérile puis stockés à 5°C. Huit autres cubes de gélose sont placés dans des microtubes contenant du glycérol (15%) stérile puis stockés à -80°C. Enfin, le mycélium est récupéré et placé dans un microtube stérile pour être stocké à -20°C avant d'en extraire l'ADN.

3.2.4. Extraction d'ADN

L'ADN est extrait du mycélium à l'aide du kit Nucleospin Plant II[®] de Macherey Nagel[™]. 400 µL de tampon de lyse et 4 µL de RNase sont ajoutés dans le microtube contenant le mycélium ainsi que deux billes d'acier. L'échantillon est broyé à l'aide du Tissue Lyser (Retsch[™], MM400) pendant, 2 x 1min30 à 30 Hz, puis incubé dans un bain à sec à 65°C pendant 20 min. Après centrifugation à vitesse maximale pendant 5 min, l'échantillon est traité selon le protocole fourni avec le kit. L'extrait d'ADN obtenu est dosé au nanodrop et on s'assure de sa pureté à l'aide des valeurs A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} .

3.2.5. Séquençage

Lorsqu'un doute persiste pour l'identification de l'espèce d'une souche, l'ADN est extrait et le gène *EF-1α* est séquençé. Pour cela, on amplifie ce gène par PCR pour l'ADN de la souche. Le mix de réaction est composé des deux amorces Ef1 et Ef2 (0,45 µM chacune), de 2 µL de l'échantillon d'ADN, de solution tampon polymérase 1X, de MgCl₂ à 2 mM, de dNTP à 2 mM chacun, de 0,5 U de Diamond[®] Taq Polymerase et d'eau ultra-pure (QSP 20 µL). Le thermocycleur dénature à 95°C pendant 10 minutes, puis il y a 35 cycles de dénaturation, hybridation et synthèse avant la synthèse finale à 72°C. Les produits de PCR sont visualisés et quantifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%.

Enfin, les produits de PCR sont envoyés à Beckman Coulter Genomics[™] (Royaume-Uni) pour séquençage. Les séquences sont alignées et corrigées avec le logiciel Sequencher². Les séquences ainsi obtenues sont comparées avec des séquences de références disponibles sur le site BLAST³ du NCBI.

3.3. MGLT

Les extraits d'ADN sélectionnés dont la liste figure en **Annexe 2**, ont été envoyés à l'Université de Peoria (Etats-Unis), *Bacterial Foodborne Pathology & Mycology Research Unit*. Cette unité de recherche de l'USDA est dirigée par le Dr. Todd J. Ward. Ce laboratoire dispose d'une technique permettant la caractérisation simultanée du chémotype et de l'espèce d'une souche de *F. graminearum* s.l. à partir de son ADN. Il s'agit de « *Multilocus Genotyping Assay* » utilisant la technologie Luminex (Luminex Corporation, Austin, TX).

² Logiciel développé par la société Gene Code Corporation

³ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

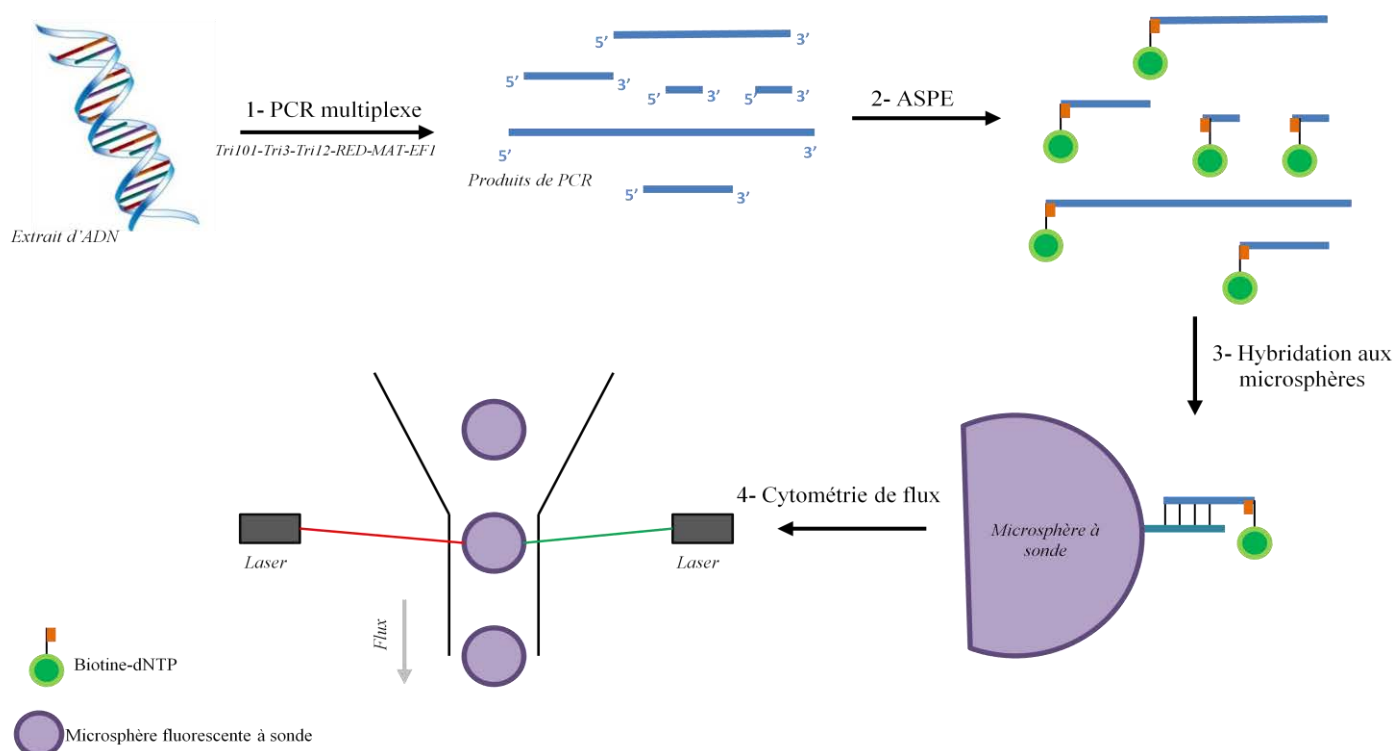


Figure 16 : Schéma de principe du MLGT (d'après Ducey *et al.*, 2007)

La première étape consiste en une réaction d'amplification de type PCR multiplex de l'ADN. Les gènes amplifiés sont le gène *Red*, codant une réductase, le gène *EF1- α* , un gène *MAT*, et les gènes *Tri101*, *Tri12*, et *Tri3* du cluster de gènes *Tri* impliqués dans la biosynthèse des trichothécènes (Merhej *et al.*, 2011). Les produits de PCR sont ensuite purifiés.

L'étape suivante de « *Allele Specific Primer Extension* » (ASPE) nécessite des sondes conçues sur la base de séquences des gènes amplifiés précédemment. La technique développée par le laboratoire utilise 41 sondes : deux pour le genre *Fusarium*, une pour la production de trichothécènes B, deux pour le complexe d'espèces *F. graminearum* (FGSC), deux par chémotype, deux pour chaque clade de FGSC et deux pour chacune des quatre espèces *F. lunisporum*, *F. cerealis*, *F. culmorum*, *F. pseudograminearum* et *F. culmorum* phylogénétiquement proches de *F. graminearum* (figure X) (Ward *et al.*, 2008).

Ces sondes sont fixées à des microsphères xMAP (Luminex Corporation) fluorescentes en polystyrène. Chacune de ces microsphères est marquée de façon unique par un mélange de colorants pour leur identification par laser. La réaction ASPE fixe des dNTP associés de la biotine aux produits de PCR, ce qui les rend fluorescents. Les produits de PCR s'hybrident ou non aux sondes et donc aux microsphères (figure 16). Les microsphères sont ensuite « lues » par cytométrie de flux selon deux lasers. Le premier laser rouge permet d'identifier la microsphère grâce à sa fluorescence. Le second laser vert capte la fluorescence émise par la biotine liée aux produits de PCR liés à la microsphère.

Chaque microsphère correspond à une sonde. Ainsi, on associe à chaque sonde la fluorescence émise par la biotine en cas d'hybridation. En révélant les sondes hybridées, on obtient l'espèce et le chémotype de l'échantillon. De plus, à chaque chémotype ou espèce sont associées deux sondes correspondant à deux gènes différents ce qui permet de confirmer le résultat du MLGT (Ward *et al.*, 2008).

4. RESULTATS

4.1. Niveau d'infection des échantillons

La figure 17 présente le pourcentage moyen de grains infectés par *Fusarium* spp. pour chaque plante-hôte dans les différentes régions de France. En effet, le nombre d'échantillons dont nous disposions et leur répartition géographique sur le territoire français ont permis de faire des regroupements régionaux pour l'analyse des résultats. Ces regroupements ont été effectués en prenant en compte la proximité géographique et climatique et en essayant d'obtenir la plus petite erreur-type possible avec un nombre satisfaisant d'échantillons par regroupement. Les échantillons de maïs dont nous disposions nous ont permis de faire quatre regroupements : Centre (N=3), Rhône-Alpes (N=7), Alsace (N=6) et Aquitaine (N=6). Trois regroupements ont pu être réalisés avec les échantillons de blé : Nord (N=8), Sud-est (N=6) et Sud-ouest (N=6). En raison du faible nombre d'échantillons d'orge disponibles (N=8) et de leur répartition sur la France, il n'a pas été possible de les regrouper par région.

Les taux moyens d'infection des échantillons de blé (12,5%) et d'orge (13,8%) sont moins importants que les taux moyens d'infection des échantillons de maïs (22,2%). Les échantillons de maïs provenant de la région Aquitaine sont les plus infectés par *Fusarium* (29,6%), ceux provenant d'Alsace sont les moins infectés (16,8%). Les échantillons de blé provenant du Sud-est sont les plus infectés (12,3%), et ceux du Nord sont les moins infectés (8,1%) par *Fusarium* spp.

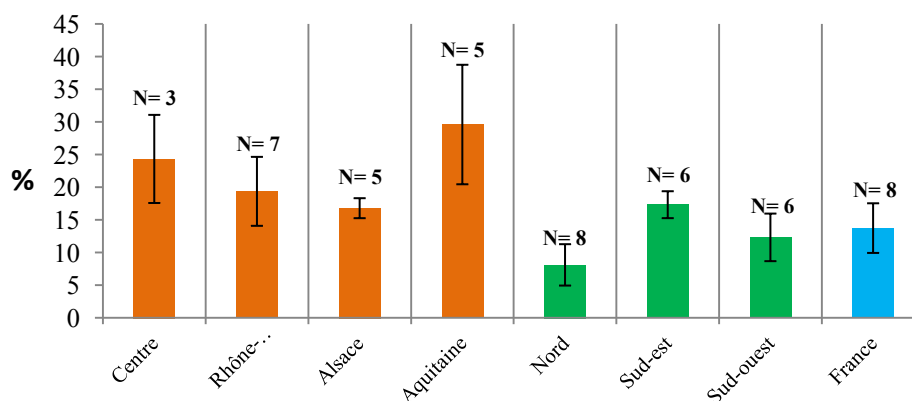
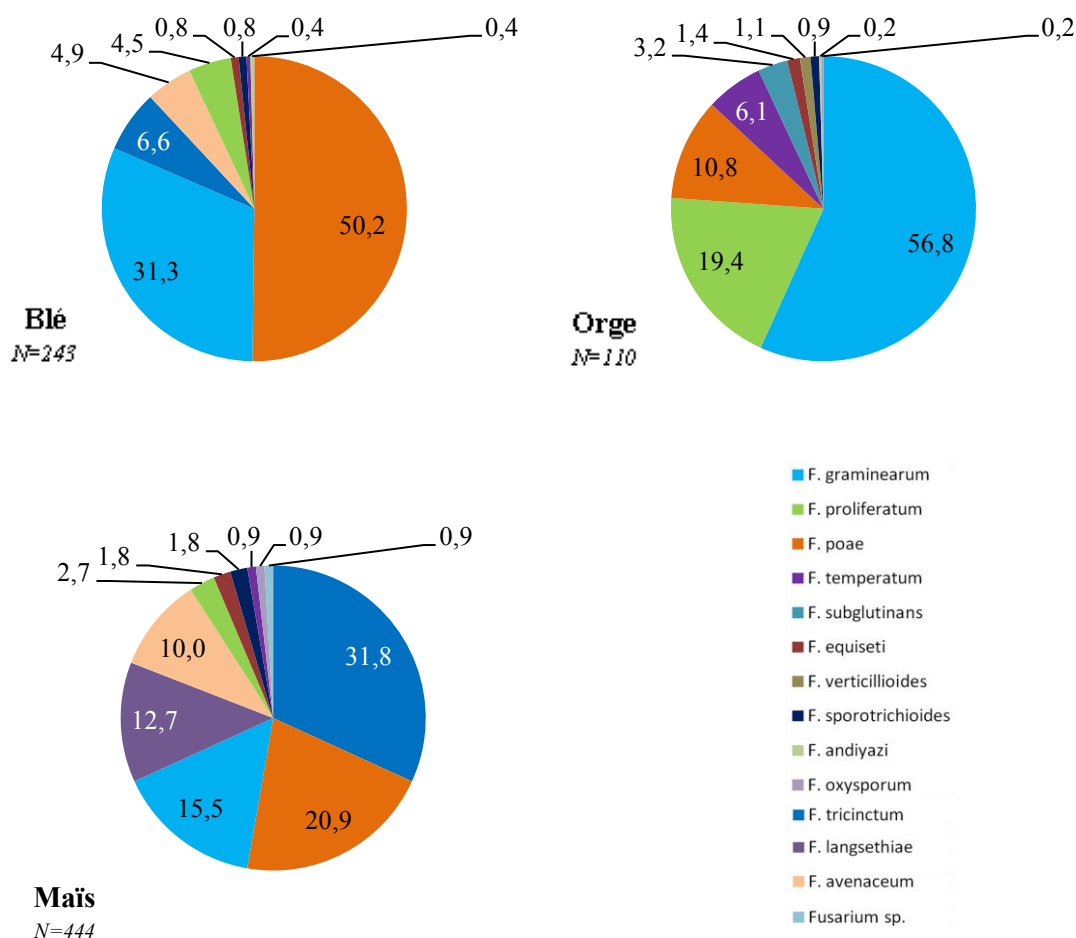


Figure 17 : Pourcentage moyen de grains de maïs (orange), de blé (vert) et d'orge (bleu) infectés par *Fusarium* spp. en fonction de la région

4.2. Diversité des espèces de *Fusarium*

4.2.1. Espèces de *Fusarium* majoritairement trouvées sur les plantes-hôtes



Figures 18 : Diversité des espèces de *Fusarium* isolées de blé, d'orge et de maïs en 2011

La figure 18 présente la diversité des espèces de *Fusarium* isolées de blé, d'orge et de maïs collectés en 2011. Sur l'ensemble des échantillons, 797 souches de *Fusarium* ont été isolées, 243 proviennent du blé (N=20), 110 de l'orge (N=8) et 444 du maïs (N=20). Au total, le gène *EF-1α* de 144 souches de *Fusarium* a été séquencé afin de confirmer l'identité de ces souches. Ces souches ont toutes été mises en collection et sont disponibles au sein du laboratoire.

En ce qui concerne le blé, *F. poae* est l'espèce majoritaire (50,2%), suivie par *F. graminearum* s.l. (31,3%), *F. tricinatum* (6,6%), *F. avenaceum* (4,9%) et *F. proliferatum* (4,5%). Sur orge, les espèces majoritaires sont *F. tricinatum* (31,8%), *F. poae* (20,9%), *F. graminearum* s.l. (15,5%), *F. langsethiae* (12,7%) et *F. avenaceum* (10,0%). Enfin, *F. graminearum* s.l. (56,8%) est l'espèce majoritaire isolée du maïs, suivie par *F. proliferatum* (19,4%), *F. poae* (10,8%) et *F. temperatum* (6,1%). Les autres espèces isolées, mais, de façon minoritaire, sont *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* et *F. temperatum* sur blé, *F. proliferatum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides* et *F. temperatum* sur orge, et *F. subglutinans*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. andiyazi*, *F. oxysporum* sur maïs. Au total, 14 espèces de *Fusarium* ont ainsi été isolées des céréales françaises en 2011.

4.2.2. Répartition des espèces à l'échelle régionale

4.2.2.1. Maïs

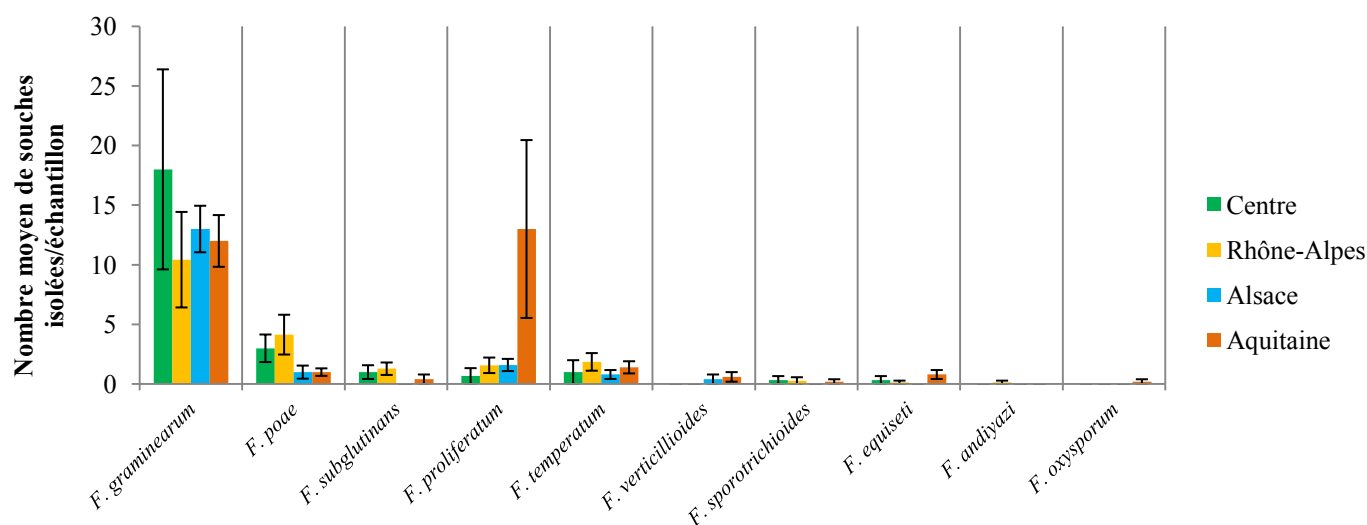


Figure 19 : Espèces de *Fusarium* isolées de maïs en fonction de la région

(Centre, $N=3$; Rhône-Alpes, $N=7$; Alsace, $N=6$, Aquitaine, $N=6$)

La figure 19 présente le nombre moyen de souches de chaque espèce de *Fusarium* isolées par échantillon de maïs. *F. graminearum* s.l. constitue l'espèce majoritaire isolée du maïs en 2011 en régions Centre, Rhône-Alpes et en Alsace. En Aquitaine, *F. proliferatum* est l'espèce prédominante. *F. poae* est la seconde espèce majoritaire en régions Centre et Rhône-Alpes alors qu'il s'agit de *F. graminearum* s.l. en Aquitaine et de *F. proliferatum* en Alsace.

Le test de Tukey ($\alpha = 0,05$) met en évidence que davantage de souches de *F. proliferatum* ont été isolées en Aquitaine que dans les autres régions. Cet effet serait dû au fait qu'un échantillon de maïs parmi les 5 échantillons provenant d'Aquitaine est particulièrement contaminé par *F. proliferatum*, 70% des souches de *Fusarium* isolées de cet échantillon étant *F. proliferatum*. Il n'a pas été possible de mettre en évidence statistiquement d'autres différences significatives en fonction des régions.

4.2.2.2. Blé

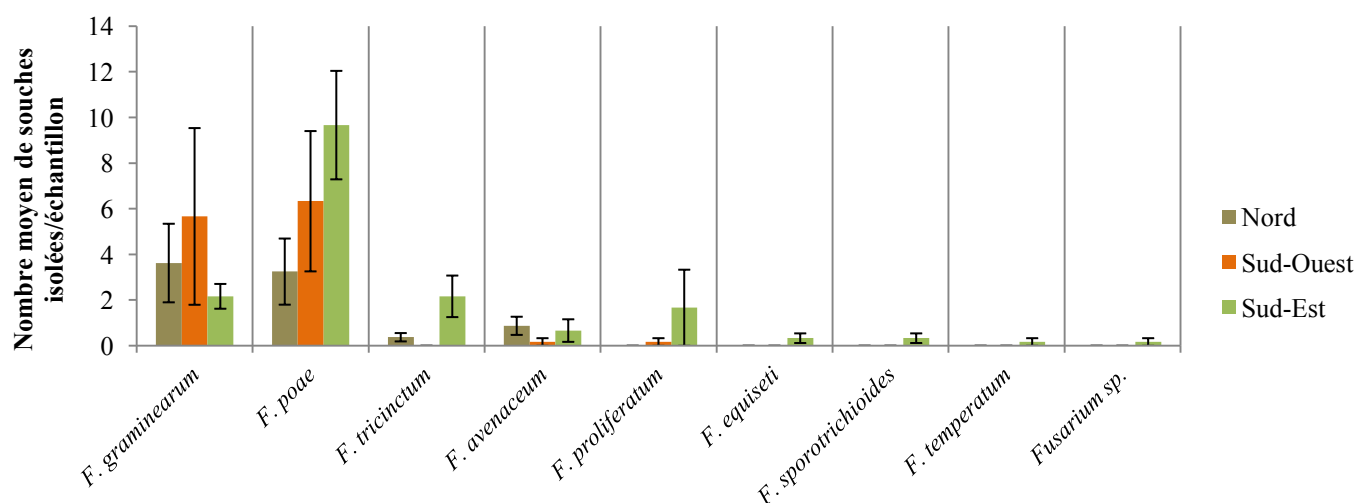


Figure 20 : Espèces de *Fusarium* trouvées sur blé par région

(Nord, $N=8$; Sud-Ouest, $N=6$; Sud-Est, $N=6$)

Les barres d'erreur représentent les erreurs-type

La figure 20 présente le nombre moyen de souches de chaque espèce de *Fusarium* isolées par échantillon de blé. Les espèces prédominantes sur blé sont *F. graminearum* s.l. et *F. poae* dans les trois régions. *F. poae* est majoritaire au Sud-est (en moyenne 55,8% des souches de *Fusarium* isolées) et au Sud ouest (51,4%) tandis que *F. graminearum* s.l. est prédominante dans le Nord (46,0%) (figure X). On observe des différences de diversité en fonction des régions, la diversité la plus grande étant observée dans le Sud-est, avec la présence de *F. tricinctum* (12,5%), *F. proliferatum* (9,7%), *F. avenaceum* (3,9%), *F. equiseti* (1,9%), *F. sporotrichioides* (1,9%), *F. temperatum* (0,2%) et *Fusarium* sp. (0,2%). Le test de Tukey ($\alpha = 0,05$) met en évidence que davantage de souches de *F. poae* et *F. tricinctum* ont été isolées au Sud-est qu'au Nord.

4.3. Diversité des espèces du FGSC et de leurs chémotypes

4.3.1 Diversité des espèces du FGSC

Dans un premier temps, 79 extraits d'ADN (cf. **Annexe 2**, souches identifiées en bleu) de *F. graminearum* s.l. isolées de blé, orge et maïs ont été envoyées au laboratoire de Todd J. Ward pour analyse par MGLT afin de caractériser l'espèce et le chémotype des souches. Les résultats ont révélé que toutes les souches appartenaient à l'espèce *F. graminearum* sensu stricto.

Des extraits d'ADN supplémentaires correspondants à 103 souches de *F. graminearum* s.l. (cf. **Annexe 2**, souches identifiées en jaune) ont été envoyés au laboratoire de Todd J. Ward pour analyse par MGLT, mais nous ne disposons pas des résultats au moment de la rédaction de ce mémoire. Les 103 souches ont été isolées d'orge (Bourgogne et Champagne-Ardenne), de maïs (Pays de la Loire, Rhône-Alpes, Alsace et Pyrénées-Atlantiques) et de blé (Rhône-Alpes, Pyrénées-Atlantiques, Basse-Normandie et Bretagne).

4.3.2. Diversité des chémotypes

La figure 21 présente les chémotypes, définis par MLGT, des souches de *F. graminearum* s.s. (N=79) isolées des trois plantes-hôtes.

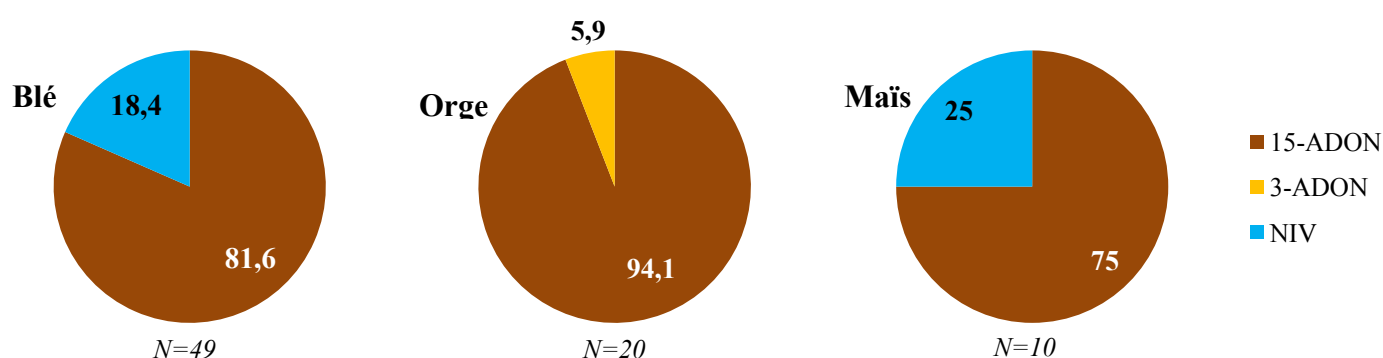


Figure 21 : Chémotypes des souches de *F. graminearum* s.s. isolées de blé (N=49), orge (N=20) et maïs (N=10). Les résultats sont exprimés en pourcentage

Les souches de *F. graminearum* s.s. avec le chémotype 15-ADON sont majoritaires quelque soit la plante-hôte. Des souches avec un chémotype NIV ont été isolées de maïs et blé, mais pas d'orge. Les souches avec un chémotype 3-ADON n'ont été isolées que de l'orge.

Il n'a pas été possible, pour l'instant, d'observer de différences régionales dans la répartition des chémotypes car les souches proviennent toutes de Lorraine pour l'orge et des

Pyrénées-Atlantiques pour le maïs. Les résultats que nous obtiendrons avec les 103 souches supplémentaires devraient permettre d'observer si des différences régionales dans la répartition des chémotypes existent.

5. DISCUSSION

5.1 Diversité du complexe fusarien sur blé, orge et maïs

5.1.1. Sur blé

Les espèces de *Fusarium* majoritaires sur blé en 2011, *F. poae* suivie par *F. graminearum* s.l., *F. tricinctum* et *F. avenaceum* sont les mêmes que celles obtenues au cours d'une étude menée en 2002 en France (Ioos *et al.*, 2004). En revanche, des différences concernant les espèces minoritaires sont observées entre l'étude menée en 2002 (Ioos *et al.*, 2004) et notre étude. Ces différences peuvent être attribuées à des conditions climatiques différentes en 2002 et en 2011, aux régions différentes où les échantillons ont été collectés, mais aussi des différences dans les pratiques culturales, les variétés de blé, les traitements fongicides. De plus, au cours de l'étude menée en 2002, les souches avaient été identifiées morphologiquement, alors que les identifications morphologiques de certaines souches de notre étude ont été confirmées par séquençage.

F. poae, espèce majoritaire isolée du blé en France en 2011 et 2002 (Ioos *et al.*, 2004), est la quatrième espèce majoritaire isolée de blé en Allemagne au cours d'une étude menée entre 2006 et 2009 (Talas *et al.*, 2011). De plus, au cours de l'étude menée par Talas *et al.* (2011), *F. culmorum* et *F. sporotrichioides* représentent deux espèces majoritaires isolées du blé en Allemagne alors qu'elles sont respectivement quatrième et cinquième en France en 2002 (Ioos *et al.*, 2004) et que seulement 2 souches de *F. sporotrichioides* et aucune de *F. culmorum* ont été isolées de nos échantillons de blé en 2011.

Les conditions climatiques influencent fortement la répartition des espèces de *Fusarium* et pourraient ainsi jouer un rôle dans les différences de diversité des espèces de *Fusarium* observées en France et en Allemagne. *F. graminearum* s.l., bien que tolérante aux conditions climatiques, est une espèce majoritaire en Europe centrale et en Europe de l'Ouest alors qu'elle est peu présente dans les pays du nord de l'Europe (Parikka *et al.*, 2012). Cependant, l'émergence de *F. graminearum* s.l. a été observée au Danemark entre 2001 et 2012 (Parikka *et al.*, 2012), au détriment de *F. culmorum* et *F. avenaceum*, deux espèces majoritaires sur blé et orge en climat humide tempéré froid. *F. poae* est une espèce favorisée par un climat chaud et sec et l'on observe que plus de souches de *F. poae* ont été isolées d'échantillons de blé provenant du sud-ouest et du sud-est que du nord de la France en 2011 (figure 20).

5.1.2. Sur orge

En 2002 (Ioos *et al.*, 2004), les espèces majoritaires sur orge étaient *F. avenaceum*, *F. graminearum* s.l., *F. poae* et *F. culmorum* (figure 18) alors qu'en 2011 il s'agit de *F. tricinctum* suivie par *F. poae*, *F. graminearum* et *F. langsethiae*. Pour l'étude menée en 2002, les échantillons provenaient pour moitié de Lorraine et pour l'autre moitié de Picardie. Dans notre étude, les échantillons d'orge provenaient de Champagne-Ardenne (N=4), de Côte-d'Or (N=1), et du Loiret (N=3). La différence de diversité et d'espèces majoritaires entre ces deux études menées en France pourraient provenir des conditions climatiques différentes mais également des lieux de récolte des échantillons différents.

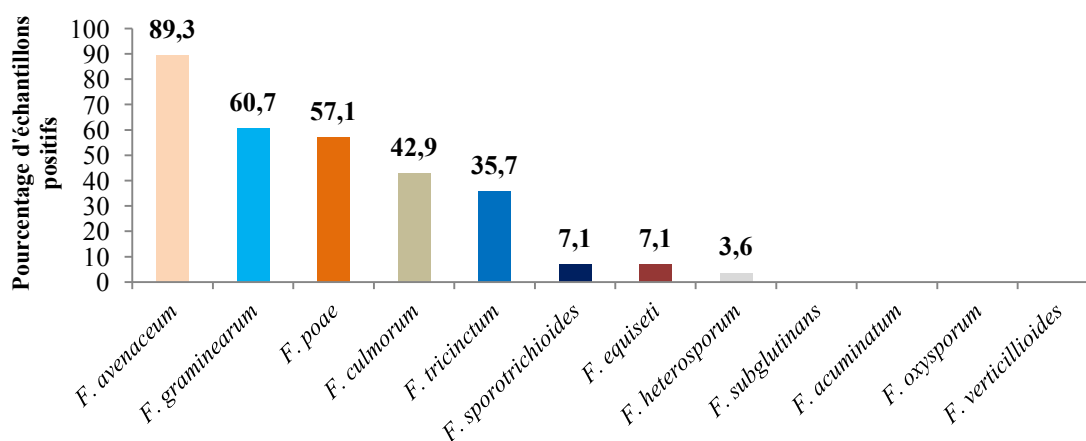


Figure 22 : Espèces de *Fusarium* trouvées sur orge (N=28) en France en 2002 (Ioos *et al.*, 2004)

F. tricinctum est considérée comme assez commune sur blé et orge dans le nord de l'Europe mais sa présence est très variable d'une année sur l'autre (Ylimäki *et al.*, 1979) ce qui peut expliquer que c'est une espèce majeure sur orge dans notre étude alors qu'elle n'était que la cinquième espèce majoritaire sur orge en 2002 (Ioos *et al.*, 2004).

F. langsethiae est une espèce décrite récemment (Torp et Nirenberg, 2004) qui étaient auparavant identifiées comme *F. poae* et surnommée « *powdery poae* » ce qui explique qu'elle n'a pas pu être identifiées en 2002. Cette espèce est considérée comme la principale productrice de trichothécènes A en Europe du Nord (Parikka *et al.*, 2012). Ces trichothécènes altèrent la qualité du maltage du grain puisqu'ils inhibent la germination des grains (Vegi *et al.*, 2011).

Enfin, notons qu'une souche de *F. temperatum* a été isolée d'un échantillon d'orge provenant du département de la Marne et de blé provenant du département du Rhône. Cette espèce a récemment été décrite sur maïs en Belgique par Scauflaire *et al.* (2011a), c'est la première fois que cette espèce est isolée d'orge et de blé.

5.1.3. Sur maïs

F. graminearum s.l. est l'espèce majoritaire sur maïs en France en 2011, ce qui est en accord avec une étude menée en Belgique en 2005-2008 (Scauflaire *et al.*, 2011b) et en Allemagne en 2006-2007 (Goertz *et al.*, 2010). C'est également une espèce majoritaire sur maïs en Argentine (Sampietro *et al.*, 2010) et en Suisse (Dorn *et al.*, 2008). La faible présence de *F. verticillioides* sur maïs en France en 2011 est en contradiction avec des études menées en Argentine (Sampietro *et al.*, 2010) et en Allemagne (Goertz *et al.*, 2010) où *F. verticillioides* était l'espèce majoritaire, mais elle est en accord avec les résultats obtenus en Belgique (Scauflaire *et al.*, 2011b). *F. proliferatum* est une espèce dominante sur maïs en France en 2011, comme en Allemagne en 2006-2007 (Goertz *et al.*, 2010), mais pas en Belgique en 2005-2008 (Scauflaire *et al.*, 2011b) où c'est une espèce minoritaire.

L'importance des espèces *F. temperatum*, *F. equiseti* et *F. oxysporum* est semblable en France et en Belgique (Scauflaire *et al.*, 2011b). *F. temperatum* est une espèce décrite récemment (Scauflaire *et al.*, 2011a), morphologiquement et phylogénétiquement proche de *F. subglutinans*. *F. temperatum* semble plus présente que *F. subglutinans* sur maïs (Scauflaire *et al.*, 2011b). De plus, à l'instar de *F. subglutinans*, elle produit des fumonisines, de la moniliformine, de la beauvericine et des enniantines (Scauflaire *et al.*, 2012). C'est donc la première fois que des souches de *Fusarium* isolées en France sont identifiées comme *F. temperatum*.

Au contraire, *F. poae* et *F. subglutinans* sont des espèces importantes en France alors qu'elles sont peu ou pas présentes en Belgique (Scauflaire *et al.*, 2011b) et en Allemagne (Goertz *et al.*, 2010). *F. cerealis* et *F. culmorum* isolées de maïs en Belgique (Scauflaire *et al.*, 2012) n'ont pas été isolées en France en 2011.

5.1.4. Les espèces du FGSC et leurs chémotypes

L'espèce *F. graminearum* s.s. semble prédominante en France, d'après nos résultats obtenus sur 79 souches pour l'instant, ce qui est en accord avec les résultats obtenus en Allemagne sur blé et maïs (Talas *et al.*, 2011), mais également au Canada (Ward *et al.*, 2008), en Afrique du Sud (Boutigny *et al.*, 2011), au Brésil (Astolfi *et al.*, 2011) et en Argentine (Alvarez *et al.*, 2011). Aucune autre espèce du complexe *F. graminearum* n'a pu être identifiée pour l'instant, 103 souches étant toujours en cours d'analyse. Alors que les 3 chémotypes sont présents parmi les souches de *F. graminearum* s.s. françaises, le chémotype 15-ADON est majoritaire indépendamment de la plante hôte, ce qui est en accord avec les résultats d'une étude menée en Italie sur blé (Prodi *et al.*, 2011) et ceux d'une étude menée en Allemagne sur blé (Talas *et al.*, 2011).

5.1.5. Changement climatique

Tous les modèles climatiques s'accordent sur une augmentation de la température moyenne mondiale. Une augmentation de 1°C de la température moyenne mondiale a pu être observée au cours du XX^e siècle (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC, 2007) ce qui accroîtrait l'importance de *F. graminearum* s.l. au détriment d'espèces comme *F. culmorum* ou *F. avenaceum* qui se développent préférentiellement en zones tempérées froides (Parikka *et al.*, 2012). On assiste bien à l'émergence de *F. graminearum* s.l., espèce très tolérante aux conditions climatiques, en France entre 2002 et 2011, et plus généralement en Europe (Talas *et al.*, 2011 ; Parikka *et al.*, 2012). Ces conditions devraient également être favorables à l'émergence de *F. subglutinans*, *F. verticillioides* et *F. temperatum* (Parikka *et al.*, 2012). De plus, le réchauffement climatique est favorable aux espèces productrices de NIV, comme *F. poae*. Son émergence est déjà observée en Norvège (Parikka *et al.*, 2012) et elle est l'espèce majoritaire sur blé en France en 2011.

Le changement climatique affecte également la répartition des espèces du FGSC. Dans les provinces de l'ouest du Canada, la fréquence du chémotype 3-ADON a été multipliée par 14 entre 1998 et 2004, ce qui représente 27,4% des souches analysées (Ward *et al.*, 2007). L'accroissement de la température moyenne mondiale et en particulier en Europe pourrait donc voir l'émergence d'un chémotype.

5.2. Effet des pratiques culturales

Les pratiques culturales sont un facteur fondamental dans le processus d'infection de *Fusarium* et donc dans la présence de maladies. Les techniques culturales simplifiées (TCS) préconisent peu ou pas de travail du sol, ce qui laisse les résidus de culture en surface. Ces résidus de culture constituent un substrat favorable au maintien de *Fusarium* sous forme de périthèces pendant l'hiver (Pereyra *et al.*, 2004), notamment *F. graminearum* et *F. culmorum* (Xu, 2003) qui pourront ainsi coloniser la culture nouvellement implantée au printemps (figure 4). Enfouir les résidus de culture permet de limiter la présence de l'inoculum primaire qui est fondamental pour l'installation du parasite.

Conclusion

La connaissance des espèces de *Fusarium* majoritaires sur céréales permet de mieux appréhender le risque sanitaire que constitue la production de mycotoxines par ces champignons et de mettre en place des moyens de lutte adaptés en prenant en compte des facteurs tels que le climat. De plus, l'observation d'espèces et de chémotypes émergents permet de prévenir le risque d'infection par les pathogènes et de contamination des aliments par les mycotoxines. La connaissance des espèces de *Fusarium* majoritaires sur céréales permet également d'orienter la sélection variétale et le choix des PPP. En effet, en France actuellement, les PPP utilisés sur blé et orge comme moyens de lutte contre la fusariose sont formulés pour contrer principalement *F. graminearum* alors que *F. poae* est une espèce majoritaire sur blé et que *F. tricinctum* est majoritaire sur orge.

6. PERSPECTIVES

6.1 Etude du FGSC en France

L'étude que nous avons menée pour la caractérisation des espèces du FGSC et de leurs chémotypes est la première de ce type en France. Une étude de 2012 au Danemark met en évidence l'émergence du chémotype 15-ADON chez *F. graminearum* s.l. depuis 1957 (Nielsen *et al.*, 2012). Il s'agirait donc de poursuivre notre étude par l'analyse des espèces et chémotypes de souches de *F. graminearum* s.l. plus anciennes afin d'observer si l'on assiste à l'émergence du chémotype NIV en France. Il serait également intéressant de reconduire notre étude à l'avenir afin d'observer la dynamique des populations de *Fusarium* du fait du changement climatique.

6.2 *Fusarium temperatum*

Ne pouvant pas distinguer morphologiquement les souches de *F. subglutinans* et de *F. temperatum*, elles ont toutes été séquencées. Dans notre étude, *F. temperatum* apparaît comme la quatrième espèce majeure sur maïs et représente 6,1% des 444 souches de *Fusarium* isolées de maïs. Une étude menée en Belgique place cette espèce comme la cinquième majoritaire sur maïs (Scauflaire *et al.*, 2011b). Nous avons isolé une souche de *F. temperatum* d'un échantillon de blé provenant du département du Rhône et une autre sur un échantillon d'orge provenant de la Marne. Nous ne pouvons conclure à l'émergence d'une telle espèce car ayant été décrite très récemment, des études plus anciennes ont pu assimiler les souches de *F. temperatum* aux souches de *F. subglutinans*. Il conviendrait donc de séquencer des souches anciennes identifiées comme *F. subglutinans* afin de conclure à l'émergence ou non de cette espèce en France.

6.3 Diversité de *F. poae*

Nos résultats mettent en évidence l'importance de *F. poae* sur les trois plantes-hôtes. De plus, cette espèce est considérée comme principale productrice de NIV dans les pays d'Europe du Nord (Stenglein, 2009) dont la toxicité est importante. Lors de la détermination morphologique des espèces de nos isolats de *Fusarium* sur PDA et SNA, nous avons remarqué une certaine diversité dans la morphologie des souches de *F. poae*. Cette diversité est notamment mise en évidence par la couleur des souches sur PDA allant du beige au rouge. Toutefois, nous n'avons pas pu observer de différence quant à la morphologie des micro- ou macroconidies au microscope photonique.

Tout comme *F. graminearum* est considérée comme un complexe d'espèces depuis les années 2000, *F. poae* pourrait être un complexe d'espèces qu'il s'agirait de décrire notamment par l'analyse du polymorphisme de plusieurs gènes tels que *EF-1 α* , des gènes Tri, RED, ou encore MAT comme cela a été le cas pour *F. graminearum* (O'Donnell *et al.*, 2000). A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a déjà été menée. Notons que l'espèce *F. langsethiae* décrite pour la première fois en 2004 étaient identifiée auparavant comme *F. poae* (Parikka *et al.*, 2012) ce qui suggère l'existence d'un complexe d'espèces.

Les 193 souches de *F. poae* que nous avons isolées sont en collection ce qui permettra d'en extraire l'ADN et de séquencer des gènes tels que ceux cités précédemment. L'analyse du polymorphisme de ces gènes permettra la construction d'un arbre phylogénétique qui pourrait permettre d'identifier des clades parmi les souches de *F. poae*.

BIBLIOGRAPHIE

- AGENCE FRANÇAISE DE SÉCURITÉ SANITAIRE DES ALIMENTS. *Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale: rapport final mars 2009*. Maisons-Alfort : AFSSA, 2009. 339 p. ISBN : 978-2-11-098837-9.
- ALEXANDER N. J., MCCORMICK S. P., WAALWIJK C., VAN DER LEE THEO, PROCTOR R. H. « The genetic basis for 3-ADON and 15-ADON trichothecene chemotypes in *Fusarium* ». *Fungal Genetics and Biology*. mai 2011. Vol. 48, n°5, p. 485-495.
- ALVAREZ C. L., SOMMA S., PROCTOR R. H., STEA G., MULÈ G., LOGRIECO A. F., PINTO V. F., MORETTI A. « Genetic Diversity in *Fusarium graminearum* from a Major Wheat-Producing Region of Argentina ». *Toxins (Basel)*. octobre 2011. Vol. 3, n°10, p. 1294-1309.
- ANDREWS S., PITT J. I. « Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. ». *Appl. Environ. Microbiol.* 6 janvier 1986. Vol. 51, n°6, p. 1235-1238.
- ASTOLFI P., REYNOSO M. M., RAMIREZ M. L., CHULZE S. N., ALVES T. C. A., TESSMANN D. J., DEL PONTE E. M. « Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil ». *Plant Pathology*. 2012. Vol. 61, n°2, p. 289-295.
- BOTTALICO A., PERRONE G. « Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe ». *European Journal of Plant Pathology*. 2002. Vol. 108, n°7, p. 611-624.
- BOUTIGNY A. L., WARD T.J., VAN COLLER G. J., FLETT B., LAMPRECHT S. C., O'DONNELL K., VILJOEN A. « Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. » *Fungal Genetics and Biology*. 2011. Vol. 153, p. 914-920.
- CARTER J. P., REZANOOR H. N., HOLDEN D., DESJARDINS A. E., PLATTNER R. D., NICHOLSON P. « Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum* ». *European Journal of Plant Pathology*. 2002. Vol. 108, n°6, p. 573-583.
- CHAMPEIL A., DORÉ T., FOURBET J. . « *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains ». *Plant Science*. juin 2004. Vol. 166, n°6, p. 1389-1415.
- DEAN R., VAN KAN J. A. L., PRETORIUS Z. A., HAMMOND-KOSACK K. E., DI PIETRO A., SPANU P. D., RUDD J. J., DICKMAN M., KAHMANN R., ELLIS J., FOSTER G. D. « The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology ». *Molecular Plant Pathology*.
- DEMEKE T., CLEAR RANDY M., PATRICK S. K., GABA D. « Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis ». *International Journal of Food Microbiology*. 15 septembre 2005. Vol. 103, n°3, p. 271-284.
- DESJARDINS A. E. *Fusarium mycotoxins: chemistry, genetics and biology*. : APS Press, 2006. 280 p. ISBN : 9780890543351.
- DESJARDINS A., PROCTOR R. « Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins ». *International journal of food microbiology*. 2007. Vol. 119, n°1-2, p. 47-50.
- DORN B., FORRER H.-R., SCHÜRCH S., VOGELGSANG S. « *Fusarium* species complex on maize in Switzerland: occurrence, prevalence, impact and mycotoxins in commercial hybrids under natural infection ». *European Journal of Plant Pathology*. 28 mars 2009. Vol. 125, n°1, p. 51-61.
- FINK-GRERNMELS J. « Mycotoxins: Their implications for human and animal health ». *Veterinary Quarterly*. 1999. Vol. 21, n°4, p. 115-120.
- GAUTAM. « Type I host resistance and Trichothecene Accumulation in *Fusarium*-infected Wheat Heads ». *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 1 février 2011. Vol. 6, n°2, p. 231-241.
- GERLACH W., NIRENBERG H., FORSTWIRTSCHAFT B. B. FÜR L. *The genus Fusarium: a pictorial atlas*. : Kommissionsverlag P. Parey, 1982. 412 p. ISBN : 9783489209003.
- GOERTZ A., ZUEHLKE S., SPITELLER M., STEINER U., DEHNE H., WAALWIJK C., DE VRIES I., OERKE E. « *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany ». *European Journal of Plant Pathology* 2010. Vol. 128, n°1, p. 101-111.

- IOOS R., BELHADJ A., MENEZ M. « Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002 ». *Mycopathologia*. 2004. Vol. 158, n°3, p. 351-362.
- JANSEN C., WETTSTEIN D. VON, SCHÄFER W., KOGEL K.-H., FELK A., MAIER F. J. « Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 novembre 2005. Vol. 102, n°46, p. 16892-16897.
- KANG Z., BUCHENAUER H. « Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: Degradation of host cell wall components and localization of trichothecene toxins in infected tissue ». *European Journal of Plant Pathology*. 2002. Vol. 108, n°7, p. 653–660.
- KIMURA MAKOTO, TAKAHASHI-ANDO N., NISHIUCHI T., OHSATO S., TOKAI T., OCHIAI N., FUJIMURA M., KUDO T., HAMAMOTO H., YAMAGUCHI I. « Molecular biology and biotechnology for reduction of *Fusarium* mycotoxin contamination ». *Pesticide Biochemistry and Physiology*. novembre 2006. Vol. 86, n°3, p. 117-123.
- LEE T., HAN Y.-K., KIM K.-H., YUN S.-H., LEE Y.-W. « Tri13 and Tri7 Determine Deoxynivalenol- and Nivalenol-Producing Chemotypes of *Gibberella zeae* ». *Applied and Environmental Microbiology*. 5 janvier 2002. Vol. 68, n°5, p. 2148-2154.
- LESLIE J. F., SUMMERELL B. A., BULLOCK S. *The Fusarium Laboratory Manual*. First edition. Blackwell Publishing, 2006. 414 p. ISBN : 9870813819196.
- MALHIPOUR A., GILBERT J., PIERCEY-NORMORE M., CLOUTIER S. « Molecular Phylogenetic Analysis, Trichothecene Chemotype Patterns, and Variation in Aggressiveness of *Fusarium* Isolates Causing Head Blight in Wheat ». *Plant Disease*, Juillet 2012. Vol. 96, n°7, p. 1016-1025.
- MCMULLEN M. P., STACK R. W. « *Fusarium* head blight (Scab) of small grains » [En ligne]. North Dakota State University, Plant Pathology Department, 2011. [Consulté le 12 juillet 2012]. Disponible sur le web : <<http://library.ndsu.edu/repository/handle/10365/17320>>
- MECA G., ZINEDINE A., BLES A., FONT G., MANES J. « Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on the Spanish markets ». *Food Chemical Toxicology*. mai 2010. Vol. 48, n°5, p. 1412-1416.
- MERHEJ J., RICHARD-FORGET F., BARREAU C. « Regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium*: recent advances and new insights ». *Applied Microbiology and Biotechnology*. 21 juin 2011. Vol. 91, n°3, p. 519-528.
- MONGRAIN D., COUTURE L., COMEAU A. « Natural occurrence of *Fusarium graminearum* on adult wheat midge and transmission to wheat spikes. ». *Cereal Research Communications*. 2000. Vol. 28, n°1/2, p. 173-180.
- NIELSEN L. K., JENSEN J. D., RODRÍGUEZ A., JØRGENSEN L. N., JUSTESEN A. F. « TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals ». *International Journal of Food Microbiology*. juin 2012. Vol. 157, n°3, p. 384-392
- O'DONNELL K., KISTLER H. C., TACKE B. K., CASPER H. H. « Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 5 juillet 2000. Vol. 97, n°14, p. 7905-7910.
- O'DONNELL K., WARD T.J., GEISER D.M., CORBY KISTLER H., AOKI T. « Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade ». *Fungal Genetics and Biology*. 2004. Vol. 41, n°6, p. 600–623.
- OSBORNE L. E., STEIN J. M. « Epidemiology of *Fusarium* head blight on small-grain cereals ». *International journal of food microbiology*. 2007. Vol. 119, n°1-2, p. 103–108.
- PAIKKA P., HAKALA K., TIILIKKALA K. « Expected shifts in *Fusarium* species' composition on cereal grain in Northern Europe due to climatic change ». *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2012. p. 1-13.
- PARRY D., JENKINSON P., MCLEOD L. « *Fusarium* Ear Blight (scab) in Small-Grain Cereals - a Review ». *Plant Pathology*. avril 1995. Vol. 44, n°2, p. 207-238.
- PEREYRA S. A., DILL-MACKY R., SIMS A. L. « Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue ». *Plant Disease*. 2004. Vol. 88, n°7, p. 724–730.

- PIRGOZLIEV S. R., EDWARDS S. G., HARE M. C., JENKINSON PETER. « Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals ». *European journal of plant pathology. Workshop of the EU COST Action 835 Agriculturally Important Toxicogenic Fungi*. Springer, 2003. p. 731-742.
- PLACINTA C. ., D'MELLO J. P. ., MACDONALD A. M. . « A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins ». *Animal Feed Science and Technology*. 31 mars 1999. Vol. 78, n°1–2, p. 21-37.
- PRODI A., PURAHONG W., TONTI S., SALOMONI D., NIPOTI P., COVARELLI L., PISI A. « Difference in chemotype composition of *Fusarium graminearum* populations isolated from durum wheat in adjacent areas separated by the Apennines in Northern-Central Italy ». *The Plant Pathology Journal*. 1 décembre 2011. Vol. 27, n°4, p. 354-359.
- ROCHA O., ANSARI K., DOOHAN F. M. « Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review ». *Food Additives and Contaminants*. 2005. Vol. 22, n°4, p. 369-378.
- SAMPIETRO D. A., DÍAZ C. G., GONZALEZ V., VATTUONE M. A., PLOPER L. D., CATALAN C. A. N., WARD T.J. « Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina ». *International Journal of Food Microbiology*. 31 janvier 2011. Vol. 145, n°1, p. 359-364.
- SARVER B. A. J., WARD TODD J., GALE LIANE R., BROZ K., CORBY KISTLER H., AOKI TAKAYUKI, NICHOLSON PAUL, CARTER J., O'DONNELL K. « Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance ». *Fungal Genetics and Biology*. décembre 2011. Vol. 48, n°12, p. 1096-1107.
- SCAUFLAIRE J., GOURGUE M., CALLEBAUT A., MUNAUT F. « *Fusarium temperatum* a mycotoxin-producing pathogen of maize ». *European Journal of Plant Pathology*. 2012. Vol. 133, n°4, p. 911-922. Disponible sur : < <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-012-9958-8> > (consulté le 1 août 2012)
- SCAUFLAIRE J., GOURGUE M., MUNAUT F. « *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans* ». *Mycologia*. 2011a. Vol. 103, n°3, p. 586-597.
- SCAUFLAIRE J., MAHIEU O., LOUVIEAUX J., FOUCART G., RENARD F., MUNAUT F. « Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium ». *European Journal of Plant Pathology*. 2011b. Vol. 131, n°1, p. 59-66.
- SCHOLLENBERGER M., DROCHNER W., MUELLER H.-M. « *Fusarium* toxins of the scirpentriol subgroup: a review ». *Mycopathologia*. septembre 2007. Vol. 164, n°3, p. 101-118.
- SMITH B. J., HOLLADAY S. D., BLAYLOCK B. L. « Hematopoietic alterations after exposure to T-2 mycotoxin ». *Toxicon*. septembre 1994. Vol. 32, n°9, p. 1115-1123.
- SOBROVA P., ADAM V., VASATKOVA A., BEKLOVA M., ZEMAN L., KIZEK R. « Deoxynivalenol and its toxicity ». *Interdisciplinary Toxicology*. 1 septembre 2010. Vol. 3, n°3, p. 94-99.
- SONDERGAARD T. E., HANSEN F. T., PURUP S., NIELSEN A. K., BONEFELD-JØRGENSEN E. C., GIESE H., SØRENSEN J. L. « Fusarin C acts like an estrogenic agonist and stimulates breast cancer cells in vitro ». *Toxicology Letters*. 28 août 2011. Vol. 205, n°2, p. 116-121.
- SORIANO J. M., GONZÁLEZ L., CATALÁ A. I. « Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1 ». *Progress in Lipid Research*. novembre 2005. Vol. 44, n°6, p. 345-356.
- SPANIC V., LEMMENS M., DREZNER G. « Morphological and molecular identification of *Fusarium* species associated with head blight on wheat in East Croatia ». *European journal of plant pathology*. Vol. 128, n°4, p. 511-516.
- STARKEY D.E., WARD T.J., AOKI T., GALE L.R., KISTLER H.C., GEISER D.M., SUGA H., TOTH B., VARGA J., O'DONNELL K. « Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity ». *Fungal Genetics and Biology*. 2007. Vol. 44, n°11, p. 1191–1204.
- STENGLEIN S. A. « *Fusarium Poae*: A Pathogen That Needs More Attention ». *Journal of Plant Pathology*. mars 2009. Vol. 91, n°1, p. 25-36.
- STEYN P. S. « Mycotoxins, general view, chemistry and structure ». *Toxicology letters*. 1995. Vol. 82, p. 843–851.
- SUMMERELL B.A., SALLEH B., LESLIE J.F. « A utilitarian approach to *Fusarium* identification ». *Plant Disease*. 2003. Vol. 87, n°2, p. 117–128.

TALAS F., PARZIES H., MIEDANER T. « Diversity in genetic structure and chemotype composition of *Fusarium graminearum* sensu stricto populations causing wheat head blight in individual fields in Germany ». *European Journal of Plant Pathology*. 2011. Vol. 131, n°1, p. 39-48.

TORP M., NIRENBERG H. I. « *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe ». *International Journal of Food Microbiology*. 15 septembre 2004. Vol. 95, n°3, p. 247-256.

UENO Y. *Trichothecenes: chemical, biological, and toxicological aspects* : Kodansha, 1983. 336 p.

VEGI A., SCHWARZ P., WOLF-HALL C. E. « Quantification of Tri5 gene, expression, and deoxynivalenol production during the malting of barley ». *International Journal of Food Microbiology*. novembre 2011. Vol. 150, n°2-3, p. 150-156.

VERSTRAETE F. « Decision-making process and overview of recent and future European Union legislation on mycotoxins in food and feed ». Barug, D., Bhatnagar, D., van Egmond, HP, van der Kamp, JW, van Osenbruggen, WA und A. Visconti (Eds.): *The Mycotoxin Factbook*, Academic Publishers, The Netherlands, Wageningen. 2006. p. 51–82.

WANG J.-H., NDOYE M., ZHANG J.-B., LI H.-P., LIAO Y.-C. « Population Structure and Genetic Diversity of the *Fusarium graminearum* Species Complex ». *Toxins*. 19 août 2011. Vol. 3, n°8, p. 1020-1037.

WARD TODD J., CLEAR RANDALL M., ROONEY A. P., O'DONNELL K., GABA D., PATRICK S., STARKEY DAVID E., GILBERT J., GEISER DAVID M., NOWICKI T. W. « An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America ». *Fungal Genetics and Biology*. avril 2007. Vol. 45, n°4, p. 473-484.

XU X. « Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight ». *European Journal of Plant Pathology*. 2003. Vol. 109, n°7, p. 683–689.

YLIMÄKI A. *Mycoflora and Occurrence of Fusarium Toxins in Finnish Grain*. Technical Research Centre of Finland, 1979. 28 p. ISBN : 9789513808006.

YLI-MATTILA T., GAGKAEVA T., WARD T. J., AOKI T., KISTLER H. C., O'DONNELL K. « A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East ». *Mycologia*. 17 juillet 2009. Vol. 101, n°6, p. 841-852.

ZHANG J.-B., LI H.-P., DANG F.-J., QU B., XU Y.-B., ZHAO C.-S., LIAO Y.-C. « Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China ». *Mycological Research*. août 2007. Vol. 111, n°8, p. 967-975.

ANNEXE 1

Composition des milieux de culture

DCPA	
Pour 1L	(g)
Bactopeptone	15
MgSO ₄ (H ₂ O) ₇	0,5
K ₂ HPO ₄	1
Chloramphenicol	2
Dichloran	1
Crystal violet	1
Agar	15

PDA	
Pour 1L	(g)
Amidon de pomme de terre	4
Dextrose	20
Agar	15

SNA	
Pour 1L	(g)
K ₂ HPO ₄	1
KNO ₃	1
MgSO ₄ (H ₂ O) ₇	0,5
KCl	0,5
Glucose	0,2
Saccharose	0,2
Agar	20

ANNEXE 2

Liste des extraits d'ADN de *F. graminearum* s.l. analysés par MLGT

Plante-hôte	Région d'origine	Nombre d'échantillons
BLE	Ile de France	9
	Languedoc-Roussillon	33
	Auvergne	7
	Drome	5
	Essonne	2
	Tarn	3
	Eure-et-Loir	4
	Puy-de-Dôme	4
	Ille-et-Vilaine	3
	Rhône	1
	Calvados	2
	Tarn	4
	Gers	1
	Total :	79
MAÏS	Sud-Ouest	9
	Puy-de-Dôme	1
	Finistère	1
	Loir-et-Cher	14
	Rhône-Alpes	22
	Haut-Rhin	17
	Pyrénées-Atlantiques	17
	Total :	83
ORGE	Ardennes	8
	Lorraine	12
	Marne	5
	Côte d'Or	3
	Total :	30
TOTAL :		172

RESUME

La fusariose est une phytopathologie affectant les céréales qui impacte le rendement et la qualité du grain. La plupart des espèces de *Fusarium*, agents de la fusariose, produisent des mycotoxines les plus répandues étant les trichothécènes dont le déoxynivalénol, le nivalénol, la zéaralénone et les fumonisines. Aucun recensement de la diversité des espèces de *Fusarium* retrouvées sur maïs n'a été fait en France jusqu'à présent. De plus, *Fusarium graminearum* est considérée comme l'espèce de *Fusarium* majeure sur céréales et produit des trichothécènes. Elle est considérée depuis les années 2000 comme un complexe de 15 espèces produisant différents trichothécènes de type B. L'objet de cette étude est donc de caractériser la diversité des espèces de *Fusarium* présentes sur blé, orge et maïs puis de caractériser par MLGT les espèces et chémotypes de *F. graminearum* s.l. trouvées sur ces plantes-hôtes, ce qui n'avait jamais été fait en France auparavant. Les espèces *F. graminearum* et *F. poae* sont majoritaires sur céréales en France. Toutes les souches de *F. graminearum* s.l. analysées sont *F. graminearum* s.s. et la majorité ont un chémotype 15-ADON.

Mots-clés : *Fusarium*, fusariose, mycotoxines, trichothécènes, DON, NIV, *Fusarium graminearum*, MLGT, fumonisines, zéaralénone

TITLE : Characterisation of the diversity of *Fusarium* species and their mycotoxigenic potential on French cereals

ABSTRACT

The *Fusarium* species are responsible of a major cereal disease called *Fusarium* Head Blight or Ear Rot. It causes yield losses and contaminated grain with mycotoxins such as trichothecenes. No study on the diversity of *Fusarium* species diversity on cereals has already been done in France. *F. graminearum* is now considered as a species complex with fifteen species producing different mycotoxins. We characterized *Fusarium* species diversity on cereals, and then determined *F. graminearum* s.l. species and their chemotypes. *F. graminearum* s.l. and *F. poae* are the main species on the 797 *Fusarium* strains isolated from wheat, barley and maize grain. Moreover, all *F. graminearum* s.l. isolates are *F. graminearum* and 15-ADON is the main chemotype for the three host-plants.