



**HAL**  
open science

**Contribution à la compréhension des effets des systèmes  
de culture sur l'infection des cultures de blé tendre  
d'hiver par la fusariose et la contamination des grains  
par les mycotoxines associées**

Agnès/a. Champeil

► **To cite this version:**

Agnès/a. Champeil. Contribution à la compréhension des effets des systèmes de culture sur l'infection des cultures de blé tendre d'hiver par la fusariose et la contamination des grains par les mycotoxines associées. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2004. English. NNT : 2004INAPG0015 . pastel-00001136

**HAL Id: pastel-00001136**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00001136>**

Submitted on 17 Mar 2005

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Institut National Agronomique  
Paris-Grignon

Institut National de la  
Recherche Agronomique

UMR d'Agronomie INRA/INA P-G

**Thèse de doctorat**  
*présentée en vue de l'obtention du titre de*  
**Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon**

*par*

**Agnès Champeil**

**Contribution à la compréhension des effets des systèmes de culture  
sur l'infection des cultures de blé tendre d'hiver par la fusariose  
et la contamination des grains par les mycotoxines associées**

Soutenue le mardi 16 Novembre 2004, devant le jury composé de

<b>Yves Crozat</b>	Professeur, ESA Angers	Rapporteur
<b>Serge Savary</b>	Directeur de recherche IRD	Rapporteur
<b>Anne Chandelier</b>	Attachée scientifique, Centre Wallon de Recherches Agronomiques	Examineur
<b>Thierry Doré</b>	Professeur, INA P-G	Examineur
<b>Robert Habib</b>	Directeur de recherche, INRA	Examineur
<b>Thierry Langin</b>	Directeur de recherche, CNRS	Examineur
<b>Philippe Viaux</b>	Ingénieur, ARVALIS-Institut du Végétal	Examineur



## Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à remercier Thierry Doré, qui a été pour moi un directeur de thèse attentif, positif, encourageant et confiant. Ses qualités et sa rigueur, au cours de ces trois années, ont significativement contribué à l'aboutissement de ce travail.

Je remercie également Jean-François Fourbet, qui par ses connaissances et sa patience m'a permis de combler nombre de lacunes, et par son soutien, son sourire et sa générosité, de garder confiance.

Pour de nombreuses discussions tout au long de ces trois années, je remercie notamment Philippe Verger, Viviane Calaora, Jean-Marc Seng, Michel Cassan, Thierry Langin, Marie-Hélène Jeuffroy, Renaud Ioos, Marie-Odile Bancal, Stéphane Bellon, et Claude Pope. Je remercie également tous les membres du jury de cette thèse, et notamment ses deux rapporteurs, Yves Crozat et Serge Savary.

Cette thèse n'aurait pu se faire sans l'intervention de nombreux partenaires. Je remercie particulièrement Claude Aubert et Charlotte Glachant de la Chambre d'Agriculture de Seine-et-Marne, ainsi que les cinq agriculteurs chez qui une très grande partie du travail s'est déroulée. Patients et disponibles, ils ont répondu à toutes mes questions en témoignant de leur intérêt pour mon travail. Je remercie le personnel du laboratoire d'analyse Qualtech, notamment Alexandre Corbé, pour les nombreuses analyses faites et les réponses données aux questions que je posais. Je remercie Marie-Christine Le Tarnec, pour son enthousiasme des premiers instants, Sylvie Rose, dont la disponibilité au printemps 2004, le courage et l'expertise ont été très précieuses pour réaliser les analyses mycologiques, Christian Barreau pour ses souches de *Fusarium* et Viviane Calaora, qui avec sa stagiaire et l'ensemble du personnel de Biotransfer, a réalisé les analyses moléculaires dans de courts délais. Au sein de notre laboratoire à l'INRA, de nombreuses personnes ont aussi, de près ou de loin, participé à ce travail et ainsi permis sa réalisation : merci donc à Christine Bouchard, Richard Gosse, Gilles Grandeau, Dominique Le Floch, Béatrice Le Fouillen, Patrick Saulas, Christine Souin et Véronique Tanneau pour les prélèvements et les dépouillements, et sans oublier bien sûr les rires et les bons moments. Tout au long de ces trois années -et notamment pendant les premiers mois de la thèse-, Alain Bône, notre documentaliste a réussi à trouver bien des ouvrages que je lui réclamais, et même des articles en japonais ! Stéphanie Pineau a assuré la lourde charge de mise en page de ce manuscrit. Qu'ils en soient tous grandement remerciés !

Je tiens également à remercier tous les stagiaires et personnels temporaires qui ont contribué à ce travail, ainsi que les personnels des laboratoires d'analyses de l'INRA de Bordeaux et d'Arras, et Bruno Mille de l'INRA de Rennes. Et aussi tous ceux qui ont participé aux relectures des articles comme du manuscrit, notamment G. Laffont et P. *Campelli*.

Je remercie également bien sûr le Ministère de la Recherche, la Direction Générale de l'Alimentation et l'INRA pour leur soutien financier.

Une pensée particulière est adressée aux différents thésards dont j'ai croisé le chemin pendant ces trois années, pour la complicité et le soutien partagés.

Enfin, un très grand merci à Guillaume pour sa patience et son soutien.



# Plan de thèse

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures.....	iii
Liste des encadrés .....	iv
Liste des publications en relation avec la thèse .....	v
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Analyse et synthèse bibliographique.....</b>	<b>5</b>
1- Review - <i>Fusarium</i> head blight : epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by <i>Fusarium</i> in wheat grains.....	5
2- Eléments de bibliographie structurant la problématique .....	33
<b>Chapitre 2 : Problématique.....</b>	<b>34</b>
1- Analyse des procédures d'échantillonnage pour le dosage des mycotoxines .....	35
2- Caractérisation des relations entre les symptômes de fusariose, la production de mycotoxines, et les pratiques agricoles.....	37
3- Contribution d'une caractérisation génétique des populations de <i>Fusarium</i> à la compréhension des effets des pratiques culturales .....	40
<b>Chapitre 3 : Dispositifs, mesures et méthodes d'expérimentation .....</b>	<b>43</b>
1- Dispositifs expérimentaux.....	43
1.1- Réseau de parcelles agricoles.....	43
1.2- Expérimentation analytique .....	44
1.3- Essai systèmes de longue durée (Versailles) .....	45
2- Protocoles expérimentaux .....	45
2.1- Caractérisation du milieu .....	45
2.2- Caractérisation du peuplement.....	46
2.2.1- Caractérisation des résidus .....	46
2.2.2- Caractérisation du peuplement végétal.....	46
2.2.3- Caractérisation de la contamination des grains .....	47
2.3- Méthodes employées.....	47
2.3.1- Détermination du niveau d'attaque par la fusariose .....	47
2.3.2- Méthodes d'analyse de la production de toxines.....	47
2.4- Méthodes d'analyses statistiques .....	48
<b>Chapitre 4 - Mesure des teneurs en mycotoxines : effets des procédures d'échantillonnage, et variabilité.....</b>	<b>50</b>
1- Variabilité des mesures due à la méthode d'échantillonnage et à la conservation.....	50
2- Effet de la date de prélèvement des échantillons et du type d'organe analysé sur la teneur en mycotoxines mesurée .....	57
2.1- Matériels et méthodes spécifiques .....	57
2.2- Résultats.....	57
3- Discussion - Conclusion.....	58
<b>Chapitre 5 - Relations entre les niveaux d'attaque des épis par la fusariose, les niveaux de contamination des grains par les mycotoxines, et les pratiques agricoles .....</b>	<b>61</b>
1- Influence des systèmes de culture sur les parcelles agricoles biologiques.....	62
1.1- Caractérisation des parcelles du réseau en agriculture biologique.....	62
1.1.1- Conditions environnementales des parcelles .....	62
1.1.2- Caractérisation des états du couvert végétal.....	62
1.1.3- Caractérisation des niveaux d'attaque et de contamination des parcelles .....	64
1.2- Association des pratiques agricoles sur le réseau .....	66

1.3- Effets du milieu et des pratiques culturales .....	66
1.3.1- Effets environnementaux .....	66
1.3.2- Effets des pratiques culturales .....	70
1.3.3- Influence de l'état du peuplement .....	73
1.3.4- Effets des systèmes de culture en conduite biologique .....	74
1.4- Diagnostic agronomique global sur les parcelles du réseau .....	75
2- Influence des systèmes de culture sur l'essai systèmes.....	77
2.1- Caractérisation des parcelles de l'essai.....	77
2.1.1- Caractérisation environnementale .....	77
2.1.2- Caractérisation du couvert végétal .....	77
2.2- Caractérisation des niveaux d'attaque et de contamination dans l'essai systèmes .....	78
2.3- Effets des systèmes de culture dans l'essai systèmes .....	79
2.3.1- Effets de quelques pratiques culturales particulières.....	79
2.2.1- Effets des systèmes de culture .....	81
3- Synthèse et conclusion .....	90
<b>Chapitre 6 - Apports d'une caractérisation génétique des populations de <i>Fusarium</i> pour le diagnostic des effets des systèmes de culture sur la contamination en mycotoxines</b> .....	<b>97</b>
1- Matériels et méthodes .....	98
1.1- Dispositifs .....	98
1.2- Identification des différentes espèces par analyse morphologique .....	99
1.3- Vérification de l'identification morphologique par une identification moléculaire .....	100
1.4- Caractérisation génétique du potentiel toxigène .....	100
2- Caractérisation des "profils d'espèces" observés sur les grains récoltés .....	101
2.1- Sur des épis voisins.....	102
2.2- Sur des épis éloignés à l'intérieur d'une même parcelle.....	102
2.3- Sur des épis prélevés dans différentes parcelles, du réseau ou de l'essai systèmes.....	102
2.4- Effet des pratiques culturales sur les profils d'espèces infectantes.....	103
2.5- Discussion.....	105
3- Relation entre les espèces présentes sur les grains et les symptômes de fusariose sur les épis ..	106
3.1- Effets des systèmes de culture .....	106
3.2- Effet des traitements fongicides.....	106
3.3- Discussion.....	107
4- Relation entre les espèces présentes sur les grains et la contamination de ceux-ci par les toxines .....	108
4.1- Effets des systèmes de culture .....	108
4.2- Effets des traitements fongicides .....	109
4.3- Discussion.....	110
5- Effet du potentiel génétique des souches pour la production de toxines.....	110
5.1- Variabilité intraparcellaire des profils de souches .....	110
5.2- Relation entre contamination des grains en toxines et chémotype des souches présentes sur les grains .....	111
6- Discussion - Conclusion.....	113
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>117</b>
<b>Références.....</b>	<b>124</b>
<b>Annexe 1 : Caractéristiques générales des variétés présentes dans les dispositifs.....</b>	<b>i</b>
<b>Annexe 2 : Analyse chimique des sols des parcelles suivies en 2001-02 et 2002-03.....</b>	<b>ii</b>
<b>Annexe 3 : Effets de différentes doses d'apports azotés sur la contamination en mycotoxines des grains.....</b>	<b>iv</b>
<b>Annexe 4 : Composition des milieux de culture .....</b>	<b>v</b>
<b>Annexe 5 : Méthodes de biologie moléculaire .....</b>	<b>vi</b>
<b>Annexe 6 : Tableaux de synthèse issue de la présentation orale de la thèse .....</b>	<b>viii</b>

## Liste des tableaux

- Tableau 1 : Dose journalière maximale tolérable provisoire pour différentes toxines
- Tableau 2 : Normes ou recommandations officielles pour le déoxynivalénol dans les produits céréaliers destinés à la consommation humaine
- Tableau 3 : Mycotoxines fusariennes détectées dans des lots de grains de céréales
- Tableau 2-1 : Répartition géographique de différentes espèces de champignons et caractérisation de leur capacité toxigène
- Tableau 3-1 : Principales caractéristiques des parcelles agricoles biologiques suivies
- Tableau 3-2 : Plan de “l’essai systèmes” de longue durée à Versailles : exemple de la répartition des parcelles en 2001-02
- Tableau 3-3 : Principales caractéristiques des parcelles de “l’essai systèmes” de longue durée à Versailles
- Tableau 3-4 : Stades de développement des céréales et phases de formation des composantes du rendement au cours du cycle de développement du blé
- Tableau 3-5 : Notation de la fusariose dans la littérature
- Tableau 4-1 : Contamination en mycotoxines des organes végétatifs des épis (balles et rachis) et des grains, à différents stades au cours du remplissage des grains
- Tableau 5-1-1 : Caractérisation du climat observé dans les différentes exploitations du réseau
- Tableau 5-1-2 : Classification des types de sol des différentes parcelles agricoles biologiques
- Tableau 5-1-3 : Répartition des parcelles agricoles biologiques selon l’état du couvert végétal à floraison
- Tableau 5-1-4 : Composition chimique des épis et/ou des grains
- Tableau 5-1-5 : Maladies ayant affecté les différentes parcelles agricoles biologiques
- Tableau 5-1-6 : Fréquences d’attaque par la fusariose sur bas de tiges et tiges
- Tableau 5-1-7 : Eléments pour un diagnostic sur les origines du nombre de grains par m<sup>2</sup>
- Tableau 5-1-8 : Contributions des différentes composantes du rendement à celui-ci, dans des parcelles géographiquement proches deux à deux
- Tableau 5-1-9 : Principales caractéristiques des récoltes des parcelles du réseau
- Tableau 5-1-10 : Attaque des épis par la fusariose et contamination des grains en mycotoxines, sur les parcelles agricoles biologiques du réseau (2001-02 et 2002-03)
- Tableau 5-1-11 : Résultats des régressions linéaires multiples entre les variables et périodes climatiques d’influence d’une part et les attaques ou les contaminations d’autre part, dans les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)
- Tableau 5-1-12 : Niveaux d’attaque et de contamination du blé et compositions chimiques du sol dans les parcelles du réseau, classés par types de sol
- Tableau 5-1-13 : Types de sol, attaques, contaminations et compositions chimiques du sol dans trois parcelles particulières du réseau
- Tableau 5-1-14 : Niveaux d’attaque et de contamination selon le type de précédent cultural sur les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)
- Tableau 5-1-15 : Attaque des épis selon l’histoire culturale sur les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)
- Tableau 5-1-16 : Contamination des grains selon l’histoire culturale sur les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)
- Tableau 5-1-17 : Niveaux d’attaque et de contamination selon l’histoire culturale des parcelles agricoles biologiques du réseau.
- Tableau 5-1-18 : Relation entre la variété et les niveaux d’attaque et de contamination
- Tableau 5-1-19 : Résultats des régressions linéaires multiples entre les variables de peuplement ou de climat et les niveaux d’attaque ou de contamination par déoxynivalénol, sur les parcelles du réseau en 2002-03

Tableau 5-2-1 : Caractérisation du climat des quatre dernières années, sur l'essai systèmes (1999-00, 2000-01, 2001-02 et 2002-03)

Tableau 5-2-2 : Evaluation des résidus des différents systèmes de culture de l'essai systèmes (2001-02 et 2002-03)

Tableau 5-2-3 : Résultats d'analyses de variance des effets des différents systèmes de culture sur l'état du couvert végétal à floraison, dans l'essai systèmes (2001-02 et 2002-03)

Tableau 5-2-4 : Teneurs en divers éléments des épis à la floraison (en 2002-03 dans l'essai) : analyses de variance des effets des différents systèmes de culture sur ces teneurs

Tableau 5-2-5 : Composantes du rendement et teneur en protéines des grains à la récolte

Tableau 5-2-6 : Niveaux d'attaque et de contamination en mycotoxines des parcelles de l'essai systèmes (1999-00, 2000-01, 2001-02 et 2002-03)

Tableau 5-2-7 : Effet du travail du sol sur les niveaux d'attaque et de contamination

Tableau 5-2-8 : Effet de la variété cultivée sur les niveaux d'attaque et de contamination

Tableau 6-1-1 : Mycotoxines produites par les diverses espèces de *Fusarium* des céréales

Tableau 6-1-2 : Potentiel toxigène de souches de *Fusarium* sur grains de blé : mesure de la production de toxines *in grano* et test génétique

Tableau 6-2-1 : Identification des agents de la fusariose sur des épis voisins d'une même parcelle (cultivée en système intégré dans l'essai systèmes, en 2001-02)

Tableau 6-2-2 : Variabilité du profil d'espèces infectantes sur des épis prélevés en différents endroits de deux parcelles différentes, et contamination en toxines de ces mêmes endroits

Tableau 6-2-3 : Taux d'infection des grains par les différents groupes d'espèces du complexe fusarien, et comparaison avec symptômes d'attaque (observés sur les épis) et contamination en toxines (mesurée dans les grains)

Tableau 6-2-4 : Nombres de parcelles dans les différents types de profils rencontrés

Tableau 6-3-1 : Résultats des régressions linéaires entre les taux d'infection des grains par différents groupes d'espèces infectantes et les niveaux d'attaque

Tableau 6-4-1 : Résultats des régressions linéaires entre le taux d'infection des grains par des espèces potentiellement toxigènes et les niveaux effectifs de contamination des grains par les différentes toxines

Tableau 6-5-1 : Variabilité d'un épi à l'autre (voisin) du potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. culmorum* et *F. graminearum*

Tableau 6-5-2 : Variabilité d'un endroit à un autre dans la parcelle du potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. culmorum* et *F. graminearum*

Tableau 6-5-3 : Potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. culmorum* et *F. graminearum* présentes sur les parcelles du réseau, et contamination en toxines des grains issus de ces parcelles

Tableau 6-5-4 : Potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. crookwellense*, *F. culmorum* et *F. graminearum* présentes sur les parcelles de l'essai systèmes, et contamination en toxines des grains issus de ces parcelles

Tableau A6-1 : Résultats du diagnostic agronomique sur les niveaux d'attaque et de contamination

Tableau A6-2 : Tableau de synthèse des effets du climat et des pratiques culturales sur les symptômes et la contamination par les mycotoxines fusariennes

## Liste des figures

- Figure 2-1 : Histoire d'un échantillon de grains, du prélèvement à l'analyse
- Figure 2-2 : Teneur en déoxynivalénol de surfaces élémentaires, à l'intérieur d'une parcelle de 10 ha
- Figure 2-3 : Relations étudiées par les diagnostics agronomiques
- Figure 2-4 : Construction du dispositif complet d'étude
- Figure 2-5 : Voie de biosynthèse des trichothécènes
- 
- Figure 3-1 : Localisation des exploitations (de A à E) du réseau et de l'essai de longue durée (F)
- Figure 3-2 : Symptômes de fusariose
- 
- Figure 5-1-1 : Résidus des précédents culturaux sur les parcelles agricoles biologiques à la sortie de l'hiver
- Figure 5-1-2 : Relation entre le rendement et ses composantes
- Figure 5-1-3 : Absence de corrélation entre contamination des grains en toxines et niveaux d'attaque des épis (intensité ou gravité) sur les parcelles du réseau
- Figure 5-1-4 : Classification ascendante hiérarchique de quatre pratiques culturales sur l'ensemble des parcelles du réseau
- Figure 5-1-5 : Influence des précipitations autour de la floraison sur les niveaux de contamination par les mycotoxines
- Figure 5-1-6 : Relation entre les niveaux de contamination et les principales variables climatiques à effet direct
- Figure 5-1-7 : Relation entre les niveaux d'attaque et le rapport azote sur fructose dans les épis à la floraison, sur les parcelles du réseau (2002-03)
- Figure 5-1-8 : Relation entre la contamination par déoxynivalénol et la composition chimique des épis à la floraison, sur les parcelles du réseau (2002-03)
- Figure 5-1-9 : Relation entre la contamination par nivalénol et la densité du couvert, sur l'ensemble des parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)
- Figure 5-1-10 : Classification ascendante hiérarchique des pratiques agricoles et des états du couvert dans notre réseau, sur les deux années
- Figure 5-1-11 : Classification ascendante hiérarchique des pratiques agricoles et des états du couvert sur le réseau (2002-03)
- Figure 5-1-12 : Classification ascendante hiérarchique de l'ensemble des variables d'intérêt acquises sur le réseau, au cours des deux années (2001-02 et 2002-03)
- Figure 5-1-13 : Classification ascendante hiérarchique de l'ensemble des variables d'intérêt acquises sur le réseau (2002-03)
- Figure 5-2-1 : Intensité des attaques de fusariose sur bas de tiges et tiges, à la floraison (2001-02 et 2002-03)
- Figure 5-2-2 : Relation entre les niveaux d'attaque et les niveaux de contamination des parcelles de l'essai au cours des quatre années d'étude
- Figure 5-2-3 : Classification hiérarchique des variables, sur les parcelles de l'essai système
- 
- Figure 6-1-1 : Photographies de spores de *Fusarium*
- Figure 6-2-1 : Influence du taux d'infection des épis sur les niveaux de contamination des grains par déoxynivalénol
- Figure 6-2-2 : Profil des espèces infectantes
- Figure 6-2-3 : Relation entre le taux d'infection des grains par le complexe fusarien et la nutrition des épis à la floraison en 2002-03
- Figure 6-3-1 : Relation entre les niveaux d'attaque et le taux d'infection sur les parcelles agricoles
- Figure 6-3-2 : Relation entre les niveaux d'attaque et le taux d'infection des grains, dans l'essai systèmes
- Figure 6-3-3 : Relation entre les niveaux d'attaque des épis et le taux d'infection des grains en cas de traitements fongicides dans l'essai systèmes

- Figure 6-3-4 : Relation entre les niveaux d'attaque et le taux d'infection des grains en absence de traitement fongicide
- Figure 6-4-1 : Relation entre les niveaux de contamination des grains et leur taux d'infection par les espèces potentiellement productrices de toxines (parcelles du réseau)
- Figure 6-4-2 : Relation entre les niveaux de contamination et les taux d'infection (essai systèmes)
- Figure 6-4-3 : Relation entre les niveaux de déoxynivalénol et les taux d'infection par *F. graminearum* et *F. culmorum*
- Figure 6-4-4 : Relation entre les niveaux de nivalénol et les taux d'infection par les espèces potentiellement productrices, en absence de traitement fongicide
- Figure 6-5-1 : Relation entre les taux de déoxynivalénol et les taux d'infection par *F. culmorum* et *F. graminearum* à forte potentialité de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*)
- Figure 6-5-2 : Relation entre les taux de nivalénol et les taux d'infection par *F. poae* ainsi que *F. culmorum* et *F. graminearum* à forte potentialité de production de nivalénol
- Figure 6-6-1 : Classification ascendante hiérarchique de l'ensemble des variables d'importance sur les parcelles agricoles en 2002-03
- Figure A5-1 : Exemple de la migration des produits d'amplification de la PCR *tri5*
- Figure A5-2 : Mise au point de la PCR multiplexe *tri5- tri6*
- Figure A5-3 : Exemple de la migration des produits d'amplification de la PCR *tri5- tri6*

## Liste des encadrés

- Encadré 3-1 : Modes de production en Agriculture Biologique en Ile-de-France
- Encadré 3-2 : Définition de l'indice de nutrition azotée
- Encadré 3-3 : Principes des dosages physico-chimiques des trichothécènes

# Liste des publications en relation avec la thèse

## Articles

- Champeil A., Doré T., and Fourbet J. F., 2004. Review - *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*, 166(6), 1389-1415.
- Champeil A., Fourbet J. F., and Doré T., 2004. Effects of grain sampling procedures on *Fusarium* mycotoxins assays in wheat grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(20), 6049 -6054.
- Champeil A., Fourbet J. F., and Doré T., 2004. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 23(6), 531-537.

## Présentations orales

- Champeil A., Fourbet J. F., and Doré T., 2004. Systèmes de culture et mycotoxines fusariennes chez le blé. In Journées Jean Chevaugéon - Ve rencontre de phytopathologie / mycologie, Section mycotoxines, Aussois. (CNRS, ed.). 58.
- Champeil A., Fourbet J. F., and Doré T., 2003. Diagnostic du niveau d'attaque par la fusariose et de la contamination en mycotoxines fusariennes des grains de blé en système de culture biologique. In Séminaire Agriculture Biologique de l'INRA. (INRA. - ACTA, ed.), 46-51.

## Posters

- Champeil A., Fourbet J. F., and Doré T., 2003. Diagnostic du niveau d'attaque de fusariose et de la contamination en mycotoxines fusariennes des grains de blé en parcelles d'agriculture biologique. In 7<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes organisée par l'AFPP, Tours (AFPP, ed.).
- Fourbet J. F., Champeil A., and Doré T., 2004. Assays of mycotoxins : reliable information? In XI International IUPAC, Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Natcher Conference Center-National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. (AOAC. International, ed.), 104.
- Champeil A., Fourbet J. F., and Doré T., 2004. Cropping systems, head blight, mycotoxin production and species of the *Fusarium* complex in wheat. In Safe Consortium - Contaminants and influence of agricultural practices, Brussels. (European Commission Quality of Life Programme, ed.), 36.
- Fourbet J. F., Champeil A., Malmauret L., Doré T., and Verger P., 2002. Effect of crop system on the infestation of *Fusarium* head blight in winter wheat and on the accumulation of mycotoxins in the grain. In VII Congress of the European Society for Agronomy, Cordoba, Spain, Vol. 1, 495-496.

## Articles en cours d'écriture

Impact of *Fusarium* species in the levels of head blight attack and mycotoxin contamination in organic fields

Impact of *Fusarium* species and strains in the levels of head blight attack and mycotoxin contamination on wheat in four cropping systems.

Simulation of consumer exposition to *Fusarium* mycotoxins according to wheat crop management and grain segregation.



## Introduction

Les substances présentes dans les aliments mais potentiellement toxiques (et donc susceptibles de contribuer au risque alimentaire) se répartissent en trois grandes catégories : (i) des contaminants de l'environnement, présents naturellement ou résultant des activités humaines, comme les métalloïdes (mercure, plomb ou cadmium), les dioxines, ou les éléments radioactifs ; (ii) des xénobiotiques, tels que les produits phytosanitaires, les médicaments vétérinaires ou les additifs alimentaires ; (iii) des contaminants biologiques comme les toxines, naturellement produites par les champignons (mycotoxines) ou par les plantes cultivées elles-même ; la liste des substances réputées toxiques évolue bien sûr avec les connaissances toxicologiques, les techniques de dosage et les modes de production, de stockage et de transformation (Doré *et al.*, 2002). Des crises sanitaires dues à des intoxications alimentaires par absorption de mycotoxines ont régulièrement été décrites dans la littérature, notamment au cours du 20<sup>ème</sup> siècle (Vidal, 1990). A ces occasions cependant, aucun mouvement de société de grande ampleur n'a jusqu'ici pris corps. Depuis les années 90, en revanche, un intérêt accru est porté au thème de la sécurité sanitaire des aliments, les consommateurs recherchant de plus en plus des produits supposés les plus "sains" possibles.

La production animale a été largement touchée par de telles crises sanitaires au cours des dix dernières années : premier cas d'Encéphalopathie Spongiforme Bovine en France en 1991 et embargo commercial sur la viande bovine britannique de 1996 à 2002, crise de la dioxine dans le poulet en 1999. En ce qui concerne la production végétale, aucune véritable crise n'est encore à déplorer, bien que l'ergot de seigle (maladie due à *Claviceps purpurea*, champignon du groupe des ascomycètes) soit craint depuis le Moyen-âge, et que la méfiance actuellement présente en Europe vis-à-vis des organismes génétiquement modifiés puisse dans une certaine mesure être interprétée comme une crise -ou en tout cas une crainte- "par anticipation". On sait cependant que certains contaminants potentiellement présents dans différents végétaux -comme les nitrates ou les métaux lourds- ont des effets négatifs sur l'organisme. Pour ce qui concerne plus spécifiquement les produits céréaliers, un des éléments importants du risque alimentaire provient de la possibilité d'accumulation de mycotoxines dans les grains (Galtier *et al.*, 2000 ; Gilbert and Tekauz, 2000 ; Le Boulc'h *et al.*, 2000a ; Ternois and Hervé, 2000). Deux grands types de toxines existent : celles qui sont produites après la récolte, pendant le stockage des grains, et celles qui sont produites avant même la récolte, pendant la croissance des grains au champ. Les toxines fusariennes qui vont être étudiées dans ce travail font partie de cette dernière catégorie (Bottalico, 1998).

La contamination d'un produit d'origine végétale peut se faire à différentes étapes de la filière : production, stockage ou transport, transformation ou conditionnement (Doré *et al.*, 2002). Aucune production végétale n'échappe *a priori* aux risques liés de contamination à l'étape de production (on s'intéresse ici à l'étape de production d'une céréale) : risques provenant du sol (et des parcelles environnantes) ou aléas climatiques (pluies acides, par exemple) ; risques liés à l'exposition à des bioagresseurs (contamination par des mycotoxines) ou à des gènes indésirables ; ou risques résultant de la migration au sein des plantes de substances pourtant importantes pour les végétaux, comme les nitrates (Doré *et al.*, 2002). Plusieurs voies de contamination sont à l'œuvre lors de cette étape. Sur certaines de ces voies, une intervention culturale a peu d'effet. En effet, les polluants d'origine environnementale contaminent les végétaux *via* une absorption passive peu susceptible d'être modulée par les pratiques culturales. *A contrario*, la contamination par d'autres polluants peut être fortement influencée par les pratiques culturales : ainsi l'application d'un fongicide peut-elle limiter le développement et la multiplication des champignons (voie proliférative de contamination des plantes), à l'origine de la production des mycotoxines ; mentionnons également que le choix de semer des plantes transgéniques peut induire une contamination génétique, en disséminant des gènes



éventuellement indésirables dans les autres cultures ; enfin, pour dernier exemple, on peut rappeler que les apports d'engrais azotés, en influençant les flux de nitrates au sein de la plante, conditionnent les teneurs en nitrate des organes finalement récoltés (c'est-à-dire qu'ils influencent la "voie métabolique de contamination des plantes"). Notre thèse s'inscrit ainsi dans une première perspective : **définir des pratiques agricoles permettant de limiter les risques sanitaires** liés aux mycotoxines susceptibles de contaminer le blé tendre, en se basant sur les étapes clés de la contamination.

Par ailleurs, rationaliser les pratiques agricoles pour maîtriser d'éventuels bioagresseurs (adventices, insectes, nématodes, agents pathogènes...) et leurs conséquences (baisse de rendement, accumulation de toxines dans les organes récoltés...) s'inscrit dans le souci de la "protection intégrée des cultures". Le concept de "protection intégrée" consiste à chercher une "*optimisation économique et écologique des moyens de contrôle des ennemis des cultures (qui peut être atteinte par la coordination de plusieurs tactiques), pour maintenir les dégâts dans la production végétale en deçà d'un seuil économique critique tout en minimisant les éventuelles conséquences néfastes de ce maintien pour l'homme, l'animal, les plantes et l'environnement*" (Office of Technology Assessment U.S. Congress, 1990). Il s'agit bien de réguler les populations d'organismes extérieurs à la culture (et susceptibles d'avoir un impact négatif sur le rendement), mais par d'autres moyens de protection que le "tout chimique". Le recours à une telle "protection intégrée" se développe pour faire face à trois caractéristiques fâcheuses des protections exclusivement chimiques : leur coût (qui ne cesse d'augmenter alors que le prix des denrées ne cesse de diminuer) ; les problèmes écologiques qu'elles entraînent (déplacement de flore et présence de résidus de produits phytosanitaires dans les récoltes et dans l'environnement) ; et enfin leur inéluctable perte progressive d'efficacité (due à l'apparition de résistances chez les agents pathogènes visés par le produit). Notre travail de thèse s'inscrit également dans cette deuxième perspective, la **maîtrise des bioagresseurs par des méthodes de "protection intégrée des cultures"**.

Plus spécifiquement, le présent travail a pour objet d'étude la culture du blé et sa contamination par la fusariose de l'épi. La fusariose, ou brûlure de l'épi (qui sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant), est une maladie fongique qui affecte de nombreuses espèces végétales à petits grains partout dans le monde (Atanasoff, 1920 ; Sutton, 1982 ; Wang and Miller, 1988 ; Miller *et al.*, 1991 ; Mesterhazy, 1995 ; Parry *et al.*, 1995 ; McMullen *et al.*, 1997 ; Bottalico, 1998 ; Rudd *et al.*, 2001 ; Bottalico and Perrone, 2002). L'objectif de cette thèse est de contribuer à la compréhension des relations entre, d'une part, les niveaux d'attaque des cultures par la maladie et/ou les niveaux de contamination par les toxines associées, et, d'autre part, les différentes pratiques culturales employées et/ou les différents complexes d'espèces de champignons présents sur les parcelles. Ce travail, à la croisée des enjeux de sécurité sanitaire des aliments et des enjeux de la protection intégrée des cultures, est un premier pas pour permettre de déboucher, à terme, sur la définition de systèmes de culture permettant de minimiser la fusariose de l'épi et le risque sanitaire associé à ces mycotoxines.

L'intérêt porté à la fusariose a été initialement dû aux répercussions de cette maladie sur les plantes cultivées, pouvant entraîner jusqu'à 50% de perte de rendement des cultures (Atanasoff, 1920 ; Mesterhazy and Rowaished, 1977 ; Parry *et al.*, 1995 ; McMullen *et al.*, 1997). La fusariose résulte du développement de pathogènes susceptibles d'appartenir à l'un ou à l'autre de deux genres de champignon : *Fusarium* (du groupe *Ascomycètes*) et *Microdochium* (du groupe *Deuteromycètes*, phylogénétiquement proche des *Ascomycètes*) (Cassini, 1970 ; Daamen *et al.*, 1991 ; Caron, 1993 ; Jenkinson and Parry, 1994a ; Bottalico, 1998 ; Ban, 2000 ; Dill-Macky and Jones, 2000 ; Ioos and Bakan, 2000 ; Maumené *et al.*, 2000a ; Maumené *et al.*, 2000b ; Ioos, 2001 ; Simpson *et al.*, 2001). Depuis 1950 (Vidal, 1990), il a été démontré que le développement de champignons du genre *Fusarium* pouvait être responsable d'une production de mycotoxines (Sutton, 1982 ; Bottalico *et al.*, 1983 ; Miller *et al.*, 1983 ; Hart *et al.*, 1984). Ces mycotoxines sont issues du métabolisme secondaire

**Tableau 1 : Dose journalière maximale tolérable provisoire pour différentes toxines**

Mycotoxines	Dose journalière maximale tolérable provisoire (DJMTP)	Références
Déoxynivalénol	1 µg/kg de poids corporel/jour	(Codex Alimentarius Commission, 2001 ; European Commission, 2002)
Nivalénol	0,7 µg/kg de poids corporel/jour	(European Commission, 2002)
Toxines T2 ou HT2	0,006 µg/kg de poids corporel/jour	(Codex Alimentarius Commission, 2001 ; European Commission, 2002)
Fumonisines B1, B2 ou B3	2 µg/kg de poids corporel/jour	(Codex Alimentarius Commission, 2001)
Zéaralénone	0,5 µg/kg de poids corporel/jour	(JECFA, 2000)

**Tableau 2 : Normes ou recommandations officielles pour le déoxynivalénol dans les produits céréaliers destinés à la consommation humaine**

		Grains bruts/ Récolte non nettoyée	Grains nettoyés/ Farine pour	Produits finis		
Europe	Blé dur/ maïs Autres céréales	1500 µg/kg 1000 µg/kg	Alimentation	500 µg/kg		
			Petits-déjeuners	200 µg/kg		
			Pâtes alimentaires	750 µg/kg		
			Aliments pour nourrissons	100 µg/kg		
Etats-Unis, Chine, Suisse Russie,					A base de céréales	1000 µg/kg
Canada	Blé tendre	2000 µg/kg	Production meunière	1200 µg/kg		
			Aliments pour nourrissons	600 µg/kg		
Autriche, Allemagne			Alimentation	500 µg/kg	Aliments pour nourrissons	100 µg/kg
					De plus de 30% de céréales	350 µg/kg

d'après le Codex Alimentarius Commission (2003).

**Tableau 3 : Mycotoxines fusariennes détectées dans des lots de grains de céréales**

Toxines	Fréquence de détection		Gamme des teneurs observées (µg/kg)	
	Monde	Europe	Monde	Europe
Déoxynivalénol	47%	60%	1- 67000	4- 67000
Nivalénol	40%	16%	2- 37900	3- 7800
Toxine T2	8%	12%	1- 38890	1- 14000
Zéaralénone	13%	15%	2-275800	1-175000
Fumonisine B1	73%	86%	1-117520	50- 4670

d'après une synthèse de résultats réalisés par Bottalico (1998).

des champignons (Chelkowski, 1991 ; Galtier *et al.*, 2000), et sont produites lorsque la croissance du champignon s'arrête ou se ralentit fortement : elles sont des produits de l'adaptation du champignon à une situation de stress (Thouvenot, 2002). La production de ces mycotoxines entraîne une réduction de la *qualité technologique* des grains contaminés (altération de la synthèse d'enzymes nécessaires au maltage de la bière et/ou d'enzymes permettant une bonne fermentation et donc un bon gonflement du pain) (Bakan, 1998), mais aussi une dégradation de la *qualité sanitaire* des grains, puisque les toxines sont dangereuses pour les animaux comme pour les humains (IARC, 1993 ; Bakan, 1998 ; Bottalico, 1998 ; Eudes, 1998). Différentes mycotoxines fusariennes peuvent être produites (les structures chimiques sont présentées dans le chapitre 1), dont la toxicité n'est pas identique. La dose journalière maximale tolérable provisoire des principales mycotoxines fusariennes est présentée dans le **Tableau 1**.

Ces toxines sont produites dans la plupart des pays producteurs de céréales : Etats-Unis, Canada, Nouvelle-Zélande, Argentine, Pologne, Japon, Norvège, Allemagne... (Placinta *et al.*, 1999). Chaque pays a sa propre norme de commercialisation des produits céréaliers contaminés (Food and Agriculture Organization, 1997 ; Whitaker, 2003). Par exemple, pour le déoxynivalénol, l'Union Européenne n'a pas encore légiféré sur la contamination maximale des denrées animales ou humaines, mais depuis 2000, elle "recommande" de limiter l'utilisation des produits céréaliers dont la contamination en déoxynivalénol dépasserait 750 µg/kg dans les farines destinées à l'alimentation humaine ou 500 µg/kg s'il s'agit de grains consommés en l'état. En 2003, ces recommandations ont été réévaluées, selon le type de produits (**Tableau 2**). Ces recommandations se rapprochent de celles de pays comme les Etats-Unis, la Chine, la Russie, la Suisse ou le Canada (**Tableau 2**). Au contraire, d'autres pays comme l'Autriche ou l'Allemagne ont des recommandations plus strictes (**Tableau 2**). L'Union Européenne a également mis en place en 2003 des recommandations pour la zéaralénone, la somme de toxines T2 et HT2 ainsi que la somme des fumonisines B1, B2 et B3. Aucune limite maximale n'a été proposée pour la contamination par nivalénol (bien que réputé plus toxique pour l'homme que le déoxynivalénol, **Tableau 1**), 3-acétyldéoxynivalénol et 15-acétyldéoxynivalénol (trichothécènes du groupe B comme déoxynivalénol), en raison probablement de leur plus faible fréquence de détection.

Comme le montre le **Tableau 3**, les niveaux de contamination en déoxynivalénol peuvent être très largement supérieurs à ces seuils. La fréquence de la présence des différentes mycotoxines fusariennes et les niveaux de contamination que l'on peut rencontrer (**Tableau 3**) implique que le respect des recommandations définies est un défi important, notamment pour l'Europe. L'enjeu est également significatif en France, même si les niveaux de contamination semblent plus "faibles" (jusqu'à 9000 µg/kg de déoxynivalénol tout de même (un seul lot a présenté un taux supérieur de contamination de 50000 µg/kg de déoxynivalénol), et jusqu'à 340 µg/kg de nivalénol, 10000 µg/kg de fumonisine B1 ou 1820 µg/kg de zéaralénone) dans les lots récoltés en France lors des premières campagnes d'études réalisées (Fourbet *et al.*, 2001 ; AFSSA, 2002 ; Direction Générale de l'Alimentation, 2002 ; Malmauret *et al.*, 2002 ; Scientific Cooperation (SCOOP), 2003) que dans les lots récoltés aux Etats-Unis ou au Canada (souvent plus de 10000 µg/kg de déoxynivalénol). C'est cette production de toxines, davantage encore que les pertes de rendement occasionnées par la maladie, qui est actuellement la raison principale de l'intérêt des scientifiques et des professionnels pour la fusariose.

Le climat est réputé être le déterminant principal du développement de la fusariose de l'épi (Langseth *et al.*, 1995), et pourrait donc également jouer un grand rôle dans la production de toxines par les champignons (Sutton, 1982 ; Chelkowski *et al.*, 2000 ; Blaney and Dodman, 2002 ; Hooker *et al.*, 2002 ; Magan *et al.*, 2002). Mais le climat est bien sûr incontrôlable en plein champ, et difficilement



prévisible. Une même année, deux parcelles voisines, cultivées différemment, ne sont pas toujours infectées de la même façon (Dill-Macky and Jones, 2000 ; Fourbet *et al.*, 2001). Il est donc vraisemblablement possible, dans une certaine mesure, de maîtriser la production de mycotoxines fusariennes en optimisant le système de culture. Essayer de comprendre, si cela est possible, les effets des pratiques agricoles sur cette maladie et la production de toxines associées est dès lors un enjeu important. C'est l'objet de cette thèse.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente une revue bibliographique décrivant les connaissances actuelles (et les lacunes qui subsistent), tant en ce qui concerne l'épidémiologie de la maladie que les effets des pratiques agricoles sur la fusariose de l'épi et la production de mycotoxines associées. Les questions scientifiques auxquelles tente de répondre notre étude sont reprises dans le second chapitre, qui expose donc la problématique de la thèse. Le troisième chapitre détaille les dispositifs mis en place afin de répondre à ces questions, les différents types de mesures réalisées pour caractériser les peuplements et les milieux, ainsi que les méthodes utilisées pour déterminer les taux d'attaque des épis par la fusariose et de contamination des grains par les toxines. Les trois chapitres suivants correspondent aux résultats acquis concernant :

- les procédures d'échantillonnage pour le dosage des toxines (**Chapitre 4**) ; ce volet a notamment pour objectif d'identifier et d'évaluer les sources d'erreur associées à nos différentes pratiques d'échantillonnage ;
- les résultats des diagnostics agronomiques réalisés (**Chapitre 5**) pour tenter de corréler les attaques de fusariose et les contaminations en mycotoxines à certaines variables environnementales, à certains états du couvert, à certaines pratiques culturales, ou encore à certaines combinaisons de ces différentes variables ;
- la contribution pour ce travail de l'identification précise des différents pathogènes présents dans les parcelles (**Chapitre 6**).



## Chapitre 1 : Analyse et synthèse bibliographique

Ce chapitre a pour objectif de faire un point sur les connaissances actuelles relatives à l'épidémiologie de la fusariose de l'épi de blé et à l'influence des différentes pratiques culturales sur le développement de la maladie et la production des toxines fusariennes. Ces connaissances serviront de base à la définition de notre problématique dans le chapitre 2 ; elles seront utilisées dans le chapitre 3 pour justifier le choix de nos méthodes et procédures d'analyse, et seront bien sûr de nouveau mises à profit lors de la discussion de nos résultats.

La première partie de ce chapitre est une revue bibliographique détaillée (publiée dans "*Plant Science*") sur l'épidémiologie de la fusariose de l'épi, sur les influences des différentes pratiques culturales sur le développement de la maladie et la production de toxines fusariennes, et enfin, sur les relations entre la gravité des symptômes de fusariose et le niveau de production de toxines. Les éléments de cette revue qui nous ont servi de base pour définir notre problématique (**Chapitre 2**) seront repris dans la deuxième partie de ce chapitre.

### **1- Review - *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**

1. Introduction	6
2. Epidemiological study of the disease	8
3. Effects of various cultural practices on the disease	12
4. Effects of various cultural practices on the production of mycotoxins by <i>Fusarium</i>	18
5. Relationship between the disease and toxin production	20
6. Conclusion	24
References	26



Review

# *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

A. Champeil\*, T. Doré, J.F. Fourbet

UMR of Agronomy INRA INA-PG, 78850 Thiverval-Grignon, France

Received 19 November 2003; received in revised form 10 February 2004; accepted 10 February 2004

## Abstract

*Fusarium* head blight is an ancient disease and is very common throughout the world. In this article, we review current knowledge concerning the effects of cultural practices on the development of head blight and the production of toxins in the field. The qualitative effects of these practices on the severity of the disease and/or the production of toxins are in the process of being elucidated but, in many cases, detailed studies have not yet been carried out or conflicting results have been obtained. However, it should be noted that these effects have not yet been quantified. Three different cultural practices are today considered to be of prime importance for combating this disease and the production of mycotoxins: deep tillage, the choice of the preceding crop in the rotation and the choice of appropriate cultivar, as varietal effects exist.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Head blight; *Fusarium*; *Microdochium*; Wheat; Cropping systems; Mycotoxins

## 1. Introduction

Head blight is a fungal disease affecting many small-grain plant species world-wide [1–10]. Affected wheat grains are small, light (the kernel is degraded), wrinkled and sometimes covered with a white or pink down. Rings or oval stains with brown edges and clear centres may be visible on the back of the grain [1,2,6,11–13] and on the external surface of the glumes (Fig. 1). Head blight results from the development of a complex of two genera of pathogenic fungi: *Microdochium* and *Fusarium* [8,14–22]. *Microdochium* consists of a single species, *Microdochium nivale*, made up of two subspecies: *M. nivale nivale* and *M. nivale majus*. *Fusarium* consists of five main species (*Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium poae* and *Fusarium triticum*), with several strains per species. The most common of these species are *F. graminearum* and *F. culmorum* [2,4,5,23–27], which are also the most pathogenic, reducing the size of the grains and in fine of the yield [24,28].

### 1.1. The consequences of head blight contamination

This disease was first described at the end of the 19th century in UK [29] and has economic consequences. Yield losses (flower abortion, decrease in grain weight, highly damaged grains eliminated during threshing) of wheat may reach 15 stooks (180 sheaths)/ha in cases of severe disease (according to the technical organisation dealing with cereals in France), or 50–60% [1,6,7,30] about once every 3–5 years [6,16]. In 2000, the year with the highest levels of disease in the last 10 years, up to 100% of ears were affected on certain French plots [31]. There is a non-linear relationship between the percentage of ears attacked by *M. nivale* and thousand-grain weight [19,32]. Head blight also decreases the nutritive and technological quality of the grains (degradation of proteins, baking quality, nutritive value, etc.).

Since the 1990s, interest in food health and safety has increased. For cereal products, one of the most important elements of alimentary risk is the possibility of mycotoxin accumulation on or in the grains [33–35]. Mycotoxins are the products of fungal secondary metabolism [34,36], which occurs when growth stops altogether or slows markedly [37]. These toxins result from adaptation of the growth

\* Corresponding author. Tel.: +33-130815295; fax: +33-130815425.

E-mail addresses: [champeil@grignon.inra.fr](mailto:champeil@grignon.inra.fr) (A. Champeil),  
[dore@inapg.inra.fr](mailto:dore@inapg.inra.fr) (T. Doré), [fourbet@grignon.inra.fr](mailto:fourbet@grignon.inra.fr) (J.F. Fourbet).



Fig. 1. Symptoms of *Fusarium* head blight on the external surface of wheat ear glumes.

of the fungus to stressful situations [37]. Head blight is the principal means by which mycotoxins develop in the grains before harvest. The mycotoxins produced in crops suffering from head blight are produced by fungi of the genus *Fusarium*. Fungi of the genus *Microdochium* are thought not to produce toxins [8]. Levels of the mycotoxins produced by *Fusarium* cannot be reduced after harvest by means of classical transformation procedures [38]. These toxins are chemically and thermally stable [39,40]. They may therefore be found in the raw material (grains) and in transformed products (flour, bread) or in products from animals fed with contaminated grain (meat, milk, eggs) [35].

Mycotoxins cause two types of problem. They may generate technological problems, such as negative effects on malting for beer (inhibition of enzyme synthesis) or on fermentation (inhibition of yeast growth), or even on the production of high-quality bread [38]. Indeed, *F. graminearum* modifies a protease that acts on gluten. Damage to this enzyme prevents the dough from retaining the gas produced during fermentation, resulting in heavier, less voluminous bread. Furthermore, *F. graminearum* also destroys starch grains, protein stores and cell walls [6,41,42].

Mycotoxins may also cause poisoning incidents, the principal symptoms of which are nausea, lethargy, fatty and cancerous infiltrations and possibly even death [38,43]. Six main families of mycotoxins have been studied to date: aflatoxins (B1, B2 and M1), ochratoxin A, trichothecenes (T2 toxin, deoxynivalenol (DON), etc.), zearalenone and fumonisins. *Fusarium* produces toxins of the last three groups, which may attack the liver, the kidneys, the nervous system, the circulatory system, the endocrine system, the skin, the digestive tract and the blood [44]. These toxins are thought to be highly carcinogenic, although this assertion remains unproven in most cases. However, T2 toxin has been shown to be carcinogenic [44]. The absorption of trichothecenes

has resulted in the poisoning of animals and humans in the US, Canada, the Soviet Union (as it was at the time) and Japan [39]. The massive absorption of T2 toxin was responsible for toxic alimentary aleukia in several regions of the USSR between 1942 and 1947 [34,39]. Pigs are the animals most reactive to deoxynivalenol, whereas poultry seem to be particularly resistant. Effects on humans have been observed after the absorption of 300–8000 µg/kg deoxynivalenol in India [8]. This led the public authorities to establish norms fixing maximum deoxynivalenol levels in food destined for human consumption. The European Commission has proposed setting limits of 750 µg/kg (750 ppb) in cereals and 500 µg/kg in cereal-based products such as flour. A major problem in trichothecene toxicology is the current lack of knowledge concerning the risk of food contamination by several of these toxins at the same time, as *Fusarium* can produce a multitude of toxins simultaneously [34].

### 1.2. Factors triggering attacks

The climate is known to have an effect, and is said to be the principal factor affecting the development of head blight on oat in Norway [45]: humidity determines the severity and intensity of the disease whereas precipitation and total radiation determine inoculum levels (number of spores per ear) [46]. The climate plays a role at all stages of development of the fungus [47–49]. The climate during winter affects the survival of the fungus on crop residues: during mild periods of the winter, the fungus is capable of sporulating on the cereal stubble debris [48]. In spring, the climate determines the type and quality of spores produced, together with the date of their dispersal and thus the intensity of the disease. Indeed, coincidence in the dates of spore dispersal and crop flowering, marking the start of the critical phase of infection for plants [2,6,16,50], is of prime importance in determining the intensity of the attack. In summer, together with the virulence characteristics of the fungal strain and the intrinsic resistance of the plant, climate controls competition between pathogen species, thereby controlling the rate of mycelium growth in the plant [47]. The climate may also affect the production of fungal toxins in the field [2,51–54]. The effects of climate are such that the levels of deoxynivalenol recorded on diseased crops in the field and in the glasshouse are not correlated [49]. The effects of climate are of course uncontrollable, but also difficult to predict due to their complexity.

However, in any given year, two neighbouring plots may display different levels of infection [19,55]. It must therefore be possible, to some extent, to control the production of mycotoxins by modifying the cropping system.

The literature review below aims to identify and to elucidate the relationships linking cropping systems to grain contamination by *Fusarium*, *Microdochium* or to mycotoxin production by *Fusarium*.

## 2. Epidemiological study of the disease

### 2.1. Impact of climate on the species complex

The species of fungi making up the pathogenic complex responsible for head blight may differ from year to year and from one region to another, particularly as a function of climate [6,11,56] and wheat variety [56,57]. Indeed, climate partly controls competition between the various species. Thus, at flowering, the development of *Microdochium* is favoured by lower temperatures [6,58] and rainfall [59], whereas that of *Fusarium* is favoured by high temperatures [58] and storms [59]. *F. graminearum* is generally the predominant *Fusarium* species in warmer regions, whereas the predominant species in cooler regions are *F. culmorum* [6,16,28,60], *F. avenaceum* [6] and *M. nivale* [6,16]. Furthermore, in spring (before ear emergence), drought favours the development of symptoms of *F. graminearum* and *F. culmorum* infection at the base of the plant, at the expense of other species of *Fusarium* [59].

### 2.2. Sources of inoculum

Several reservoirs of the parasite complex responsible for head blight are known. The primary reservoir of inoculum is debris from the previous crop [2,61]. All species of *Fusarium* and *Microdochium* can survive as saprophytes [6]. However, the pathogens survive longer on residues that do not degrade easily, such as stem nodes [2].

Other sources of inoculum include numerous plant hosts. These may be cultivated plants and/or weeds, such as grasses and evergreen weeds [6]. However, the roles of weeds, inoculum source (site at which the fungi develop) and supports for survival have not yet been determined [62]. Seeds are the other major source of inoculum, making it possible for the disease to begin in autumn in the case of grains contaminated with mycelium [14,16]. The further into the grain the mycelium has penetrated, the lower is the chance of the grain germinating. The soil may also be contaminated [1,2]. Soil-borne infections take hold less rapidly than seed-borne infections, resulting attacks affecting essentially the collar and the upper parts of the roots [2,14]. Soil humidity, particularly during winter, decreases the pathogen survival rate [2]. The flag leaf is the principal site of spore production and source of ear infection in the plant [32].

### 2.3. Production and maturation of inoculum

During the winter, the fungi survive as chlamydospores, mycelium or propagules [2,6]. Sporulation, which involves the production of various types of spore, occurs during mild periods [48]. Four types of asexual inoculum may be produced, depending on the species concerned: macroconidia, microconidia, chlamydospores and hyphal fragments, the size and form of which depend on the species of pathogen [63]. The macroconidia of *F. graminearum* may contain one

to seven septa—most frequently three to seven—and measure 20–105  $\mu\text{m}$  in length (mostly 35–62  $\mu\text{m}$ ), and 2–56  $\mu\text{m}$  in width [2]. This type of inoculum may be available during the entire crop cycle [16]. Sexual spores, known as ascospores, may also be produced by reproductive organs called perithecia. Only three of the species most frequently responsible for head blight appear to be capable of producing ascospores in the natural state: *M. nivale*, *F. graminearum* and *F. avenaceum* [6,16,64]. These three species produce ascospores that are similar in size and form. They generally have three septa and measure about 17.5–26  $\mu\text{m} \times 3.5\text{--}5 \mu\text{m}$  [2]. They take a long time to mature and therefore contamination cannot occur before ear emergence [16]. Caron reported that *M. nivale* produces ascospores from May onwards in France and that *F. graminearum* produces its ascospores later in the year.

In the laboratory, the optimal environmental conditions for production of the principal forms of inoculum—macroconidia and ascospores—depend on the species and the environment. These results probably cannot be directly transposed to natural conditions. Table 1 sums up the principal results reported in the literature.

The maturation of the inoculum has been studied in less detail and depends on interactions between environmental factors, both in the laboratory and in the field. The maturation of the inoculum is thought to be hindered by drought and cold in autumn and winter [65]. In the laboratory, perithecia have been reported to mature in 6–9 days [66], or 9–10 days [2] after their initiation in ideal conditions. In contrast, perithecium maturation takes 2–3 weeks in the field whereas conidiospores can be produced in large quantities within a few hours [59]. According to another study, macroconidia reach maturity in 3 weeks in the field [67]. The rate of maturation of perithecia depends on light [66,68].

### 2.4. Dispersal of the inoculum

The inoculum is dispersed by various animal vectors. Mites (*Siteroptes graminum*) transport *F. poae* spores [6]. Insects are parasitised by certain species of *Fusarium*, *Fusarium episphaeria* (SN and H) in particular [63]. *F. avenaceum*, *F. culmorum* and *F. poae* have been isolated on various insects including *Musca domestica* (housefly), *Hypera punctata* (clover leaf weevil) and *Melanoplus bivittatus* [69]. The possibility of inoculum dispersal by the systemic route has long been debated; after cutting the peduncle of a wheat ear into segments, Atanasoff [1] observed *F. graminearum* in the segments close to the ear but not in those close to the flag leaf. Following inoculation of the base of the wheat stem, only 3% of plants display colonisation beyond the second node and no fungus is detected beyond the fifth node [70]. In another study [71], the tops of plants produced from seeds inoculated with *M. nivale* presented similar numbers of perithecia to those of plants grown from healthy seeds, even though the plants grown from contaminated seeds had more perithecia at the base of the stem.

Table 1

Data on environmental conditions for the production of macroconidia and ascospores in the laboratory, according to species

Stage	Species	Determinant factors	Range	Optimal value	References	
Mycelial growth	<i>F. graminearum</i> group 2 (aerial)	Pressure	> -9 bars		[75] (on maize grains)	
		Humidity	> 94% RH			
		Pressure	> -12 bars	-2 bars	[225] (on agar)	
		Temperature	4 to 32°C	28°C	[47]	
		Pressure, Temperature	At -10 bars, T. optim 20°C At -28 bars, T. optim 30°C At -55 bars, T. optim 35°C		[16]	
	<i>F. culmorum</i>	Temperature	20 to 30°C		[23] (on osmotically adjusted agar)	
		Pressure	-10 to -28 bars			
		Accelerated by alternate periods of rainfall and drought before ear emergence				[59]
		Temperature	20 to 30°C		[23] (on osmotically adjusted agar)	
		Pressure	-8 to -14 bars			
<i>M. nivale</i>	Pressure	At -8 bars, T. optim 20°C At -14 bars T. optim 30°C At -28 bars, T. optim 38°C Maximum growth at 25°C		[16]		
	Temperature	0 to 28-32°C	18-20°C	[11, 16]		
Initiation of perithecia	<i>F. graminearum</i> group 2 (aerial) <i>F. roseum</i>	Light	Requires low intensity of UV light (300-320<390nm)		[83], with conflicting results obtained by [35].	
			Depends on the strain		[35,71]	
		Depends on humidity and rain in spring				[59]
Production de perithecia <i>F. graminearum</i> group 2 (aerial)	<i>F. graminearum</i> group 2 (aerial)	Temperature	5 to 35°C	29°C	[2,16]	
		Temperature	15 to 31°C	29°C	[83]	
		Pressure	< -50 bars, poor from -5 bars	-1.5 bars	[97] (on osmotically adjusted agar)	
		Depends on light				[68]
Production of ascospores	<i>F. graminearum</i> group 2 (aerial)	Temperature	13 to 33°C	25-28°C	[2,16]	
Production of spores	<i>M. nivale</i>	Light	UV light required			
	<i>Fusarium</i>	Temperature	< 16-18 °C	6 à 8 °C	[64]	
Production of macroconidia	<i>F. graminearum</i> group 2 (aerial)	Temperature	Around 10°C		[64]	
		Humidity	Around 80% humidity			
		Temperature	28 to 32°C None if T°<16°C or T°>36°C		[83]	
		Temperature	16-36°C	28-32°C	[47]	
		Pressure	max < -50 bars	-1.4 to -3 bars	[97] (on osmotically adjusted agar)	
	<i>F. culmorum</i>	Temperature	20 to 30°C		[23] (on osmotically adjusted agar)	
		Pressure	-10 to -28 bars			
		Temperature	20 to 30°C			
	<i>F. graminearum</i> group 1 (soil) <i>F. avenaceum</i>	Pressure	Max between -15 and -60 bars	-15 bars	[97] (on osmotically adjusted agar)	
		Temperature	20 to 30°C			
<i>F. roseum</i>	Pressure	Max between -15 and -60 bars	-15 bars	[97] (on osmotically adjusted agar)		
	Temperature	> 10°C	25 to 30°C			
<i>M. nivale</i>	Light	UV light required		[16]		
	Humidity	RH of about 100% Favoured by water stress				
<i>M. nivale</i>	Temperature	1 to 16 °C	6 to 8 °C	[16]		

Two natural populations of *F. graminearum* can be identified: Group 1 (or *F. pseudograminearum*), normally associated with the diseased crowns of host plants, which do not form perithecia in culture and form such structures only rarely in nature; and Group 2, associated with diseased of aerial plant parts, which do form perithecia [2,223–225].

This finding confirms the lack of relationship between head blight and foot rot due to *Fusarium* [6,16]. To date, these two infections have been considered to be essentially independent [1,16]. However, it should be noted that the presence of the parasite at the base of the stem (below the second node) may disturb the water supply to the ear sufficiently to cause shrivelling at the slightest increase in temperature [14]. Shrivelling of part of the ear is one of the symptoms of head blight. A confusion of symptoms is possible: in some cases, shrivelling of the ears may be due to the presence of the parasite at the base of the stem rather than on the ears. In addition, following the artificial inoculation of spring wheat seeds, sown in pots, with *F. culmorum*, the pathogen is isolated from all nodes and from the ears [72]. Similarly, Snijders [73] observed the pathogen in stem tissue 70 cm above soil level after inoculating plants at soil level. Many cases of infection with various species of *Fusarium* have been observed after the sterilisation of weeds [62] and wheat [74] with sodium hypochlorite, which suggests that these infestations are endophytic. Evidence that this is indeed the case is provided by the observation that the fungal mycelium is capable of infecting both the parenchyma and the vascular tissue, in which it is able to travel more rapidly [50]. Indeed, after the injection of spores into the rachis, these authors showed that the pathogen was able to migrate within the plant and that it propagated more rapidly longitudinally than transversely. However, it is possible that this route of contamination is only possible in a few species of plant, for a few species of fungus or for a few plant–fungus interactions.

Dispersal by leaf-to-leaf contact also seems likely as the pathogens (*Microdochium* and *Fusarium*) are found on the leaves [15]. Atanasoff [1] also observed infection by contact. This mode of dispersal should be considered to be a specific case of aerial contamination.

Aerial contamination by ascospores and conidia is thought to be the principal source of ear contamination [1]. This means of contamination has been studied by many groups and involves two possible modes of dispersal: splashing and wind [2,6,7,16,64]. The relative importance of these two modes of dispersal depends on the climate and the species making up the pathogenic complex in the year and region studied and the capacity of these species to produce ascospores.

Splashing transports spores, macroconidia in particular, that are too heavy to be transported by wind [35]. The density of *F. graminearum* macroconidia in the air above the canopy has been estimated to be only 1/20 that of ascospores from the same species [75].

Splashing is the only means of dispersal of *M. nivale* conidia [71]. Millar and Colhoun [71] were able to trap conidia only during simulated rain conditions, whereas Fernando et al. [75] observed a peak in the release of macroconidia of *F. graminearum* in the air 1–2 days after rainfall following a long period of drought. These two studies demonstrate the major role played by rainfall in the dispersal of spores. In the laboratory, a conidium of *F. graminearum*, produced

in a sporodochium (the asexual fruiting body bearing the conidiophores) from wheat straw, receiving a single drop of water 5 mm in diameter falling from a height of 6 m, was displaced by up to 45 cm in the vertical plane and 90 cm in the horizontal plane [17]. In the same conditions, a conidium of *F. culmorum* was displaced 60 cm vertically and at least 1 m horizontally [17,76]. The spores of *F. poae* may reach a height of 58 cm and may travel 70 cm horizontally in rebounding raindrops [76]. Splashing alone is therefore sufficient to transfer a conidium from crop residues or the stem base to the ear (in one or several rebounds, relayed by the leaves), assuming there is no obstacle. In the canopy, the leaves of the neighbouring plants form an obstacle. Under simulated rainfall, the wheat canopy reduces the dispersal of *Septoria tritici* spores by 33%, to 15 cm, in the horizontal plane from the source of infection, and by 63% in the vertical plane [77]. A leaf positioned low in the canopy is principally infected at its base whereas leaves higher up in the canopy are principally affected at their tips, from which the spore can rebound, resulting in their transfer to another leaf [76]. Splashing is considered to be the most likely means of dispersal because *F. avenaceum*, *F. culmorum* and *M. nivale* have been observed on the flag leaf [15]. Rainfall plays an important role in the development of the disease. In years with major epidemics of head blight or rotting of the ear due to *F. graminearum*, precipitation levels are generally high [2,7,15,78]. Similarly, in spray irrigation trials, up to 89% of ears may be infected, versus 0% in non-irrigated controls [6]. Furthermore, humidity and rainfall in spring favour the formation of perithecia [59].

In natural conditions, perithecia are formed in only the three species that generate ascospores: *F. graminearum*, *F. avenaceum* and *M. nivale* [6,16,64]. Ascospores are a form of inoculum that can be transported by the wind [6,16]. The wind has long been considered the principal vector for spore dispersal, and damage tends to be greatest in the direction of the prevailing wind [1]. Following the artificial inoculation of a zone of field with maize grains infected with *F. graminearum*, *F. graminearum* spores travel less than 5 m [75]. However, Stack [79] indicated that the dispersal distance of *F. graminearum* spores is proportional to the size of the area inoculated. According to this model, head blight levels halve as the distance to be travelled by the inoculum doubles. The maximum density of ascospores observed is 1500 spores/m<sup>2</sup>, at 1.5 m from the source of inoculum [75]. The dispersal of *F. graminearum* ascospores in the field occurs at temperatures of 13–22 °C, with a relative humidity of 95–100% [2]. Ascospore release is maximal at a relative humidity of 100%, but also occurs at lower levels of relative humidity [66].

Despite the importance of humidity, studies on *Fusarium moniliforme* [67,80] and *F. graminearum* [75] have shown that the release of ascospores is not directly linked to rainfall. Indeed, ascospore release peaks 1–4 days after rainfall [67,75] of at least 5 mm or a relative humidity exceeding 80% [67]. Paulitz found that a shower of rain in the

evening did not inhibit spore release but that heavier rain (at least 5 mm), a relative humidity exceeding 80% continuously throughout the day or the alternation of rain and high humidity inhibited the release of ascospores during the night. This result contrasts with another study showing the release of ascospores during the night following a day on which 8 mm of rain fell [81]. The correlation between spore release and humidity suggests that the maturation of perithecia requires a certain level of humidity. This would account for the results of Fernando et al. [75], who observed four periods of spore release over a period of 20–30 days. The process of ascospore release may be described as follows [71]: after a period of drought (air with low water vapour content), free water (rain or heavy dew) triggers the release of ascospores. Paulitz [67] speculated that the increase in relative humidity during the evening after a dry day might increase the turgor pressure of the asci, which contain a vacuole at high osmotic pressure [82]. This high osmotic pressure is generated by the accumulation of mannitol and the flux of potassium and calcium ions [66]. Calcium ions are also involved in signalling for ascospore discharge [66]. This increase in pressure triggers the release of ascospores, which are expelled from the perithecia in a gelatinous substance, which then dries out, releasing the ascospores into dry air. This would account for the finding that a trap placed above the canopy captures several *M. nivale* ascospores in dry conditions and that the concentration of these spores increases by a factor of 20 in the 10 min following the application of a fine simulated dew [71]. A similar phenomenon has also been observed for the ascospores of *F. graminearum* [6]. Similarly, in control conditions, the maximal release of *F. graminearum* ascospores is regulated by dehydration of the perithecia in non-saturated humidity conditions [83]. Furthermore, the time at which the spores are released is strongly correlated with the increase in humidity following the decrease in temperature that occurs at the end of the afternoon [67]. Paulitz observed that ascospore release began before the leaves became humid at the base of the canopy (which occurred at 22–24 h), towards 17 or 18 h for temperatures varying between 11 and 30 °C and values of relative humidity of between 60 and 95%. These results have been confirmed by the observation, in control conditions, that the maximal release of *F. graminearum* spores occurs at temperatures between 11 and 23 °C, with 16 °C the optimal temperature [83].

After temperature and humidity, the next most important environmental factor affecting ascospore release is light. Light is required for the production and maturation of perithecia [68] and ascospores [83]. In contrast, the process of ascospore release does not directly require light, as it has been observed during the night: 4–5 h before sunrise [67]. This result has been corroborated by studies in control conditions, which also showed that light had no effect on ascospore release [66,68].

Finally, the periodicity of aerial dispersion has been studied. The release of conidia is not periodic, whereas that of

ascospores is, particularly in *F. graminearum* [75]. Indeed, Fernando et al. detected no ascospores in the air between 12:00 and 16:00 h, whereas ascospore density was maximal between 20:00 and 08:00 h (1.5 times higher than at other periods of the day). Other authors have reported that ascospore density peaks between 21:00 and 08:00 h [84]. Similarly, Paulitz reported that spore release often occurs between 18:00 h and early morning (04:00–08:00 h), mostly before midnight, with a peak at around 23:00 h [67]. For *F. graminearum*, the maximum ascospore concentration observed is of the order of 4333 ascospores/mm<sup>3</sup> in 1 h. Paulitz also reported spores of other species of *Fusarium* to be continuously present in the air, but with densities varying according to the period of the day. Paulitz identified four distinct periods in the day, and found that spore density was low in the morning. For *F. moniliforme*, a large number of ascospores was found to be released between 17:00 and 08:00 h, with a peak towards 02:00 h [80].

Although dispersal over large distances seems to be possible, local aerial contamination appears to predominate, in that two neighbouring plots of land planted with the same variety may display very different levels of contamination [19,55].

## 2.5. Infection and colonisation of the ear

In wheat, the most critical period corresponds to the moment at which the degree of resistance to primary infection and to the propagation of fungal hyphae in the plant is lowest. This period has been defined differently by different authors, but the first half of the grain-filling period is the most critical. Several authors have identified ear emergence [64,85] or the mid-grain-filling stage [47] as the most critical, but most authors consider anthesis to be the most susceptible to attack in wheat [12,16,64,86,87], with susceptibility decreasing strongly after the start of the dough stage [12,16,47,64,86,87]. Elimination of the male organs from wheat ears decreases the frequency of infection by *F. graminearum* [47,86]. Similarly, sterile wheat lines are less susceptible to head blight than fertile lines [88]. This, together with extensive colonisation of the anthers by this fungus [86] indicates that the growth of *F. graminearum* is stimulated in these structures, suggesting that entry into the anthers during anthesis has major consequences for the grain (degradation). Two substances—choline chloride and betaine hydrochloride—are much more concentrated in the anthers than elsewhere [89]. These substances favour the extension of conidial hyphae, but not the germination of spores of *F. avenaceum*, *F. culmorum* and *F. graminearum* [89]. Once the spores have germinated, the propagation of the hyphae is therefore more strongly favoured in the flower parts than in the other organs. However, the difference in susceptibility of different stages is probably due to the fact that the critical receptivity peak observed (degree of resistance to primary infection and propagation of fungal hyphae) is dependent on many factors. These factors include the wheat

cultivar [12,47,50,90], air temperature and humidity [12,47] at the critical stage for the plant and, before this stage, development of the inoculum, and the stage of maturity of the plant at the time of hyphal penetration [12]. The testa (seed coat) is more resistant to penetration when the grains are mature [12]. However, this finding remains open to debate because a recent study [91] showed that the date of inoculation has no effect on the final level of *F. graminearum* colonisation. In maize, susceptibility to the disease is maximal at the start of silk development and decreases throughout the grain-filling period [92]. In *Arabidopsis thaliana*, tobacco, tomato and soybean, the floral tissues are also the most heavily infected [93].

The infection process is very similar in susceptible and resistant varieties [94]. The pathogen first penetrates host tissues 36–48 h after inoculation [94]. The first organs affected are the lemmae and the tip of the ovary [94,95], the anthers [12] and/or the spikelets, glumes and the rachis [50]. It remains unclear which of these organs is most frequently the initial zone infected, but this probably depends on the date of infection and possibly also on the infecting species. The penetration of the fungus into the ear is favoured by relatively low temperatures and high humidity [64]. The presence of and colonisation by a large number of hyphae are required for infection [50]. The hyphae of *F. graminearum* and/or *F. culmorum* invade the host tissue directly [94] or via the stomata [50]. They then propagate into the ear, passing through and around the cells in their path [12,94–96], degrading the cells that they contaminate [50,94,96]. They move principally towards the rachis [94,95] or towards the young grains, which they invade via the parenchyma of the pericarp close to the embryo [50]. A short time after flowering, the parenchyma of the pericarp begins to break down, the nuclei and cytoplasm of the cells disappear and the walls of the cell break [12]. *F. graminearum* is then able to enter this tissue and propagate throughout the grain [12]. Indeed, *F. graminearum* hyphae penetrate the thinner cell walls of the parenchyma tissue more easily than the thicker cell walls of other more specialised tissues [12]. Birds also facilitate infection by creating lesions on the grains that favour the penetration of fungi [2].

Infection of the ears by macroconidia of *F. graminearum* [47], *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. poae* and *M. nivale* [6] is optimal at 100% relative humidity and 25 °C, and takes place over 24–60 h. Infection may occur at temperatures of 20–30 °C, but is negligible at temperatures below 15 °C [47]. Below 18 °C, the conidia of *M. nivale* are more competitive than those of *Fusarium*, resulting in higher levels of *M. nivale* contamination. Furthermore, a period of 4–8 days of low humidity reduces the incidence of infection, but does not entirely eliminate it [47]. The germination of macroconidia, ascospores and chlamydospores is maximal between 0 and –20 bar and is inhibited between –60 and –80 bar [97]. Ascospore germination is inhibited beyond a threshold of –30 bar (–3 MPa) of water potential after 8 h of drought [67]. Free water or a low water potential also favours

infection, reducing the length of the incubation period [67].

## 2.6. Incubation and sporulation

Perithecia and conidia develop on the surface of spikelets and of the rachis in humid climatic conditions [2]. The duration of the incubation period required decreases with increasing humidity [16]. In conditions of saturating humidity, the duration of incubation required for the appearance of macroconidia of *F. culmorum* and *F. graminearum* on the ear was 12 days at 14 °C, less than 5 days at 20 °C and less than 3 days between 25 and 30 °C [2,16]. More spores are formed after a long period of high humidity. This may then result in the infection of later crops, such as maize.

## 3. Effects of various cultural practices on the disease

Various studies have identified different elements concerning the effects of agricultural practices (crop rotation, crop management) on head blight attacks.

### 3.1. Effects of the crop succession history of the field

The effects of crop rotation have been studied in detail. They depend on the preceding crop, whether that crop is a potential host for the pathogens responsible for head blight, and the frequency of the crop concerned in the rotation. The shorter the rotation, the higher the frequency of head blight. Thus, head blight is most frequent when the susceptible crop occurs frequently within the rotation [7]. The density of crop residues left in the field [19], their nutritional value [19] and pathogen competition may also modify the effect of crop rotation [19,62].

Head blight contamination is more severe if the preceding crop is maize, durum wheat or oats, rather than wheat or barley [14,19,48,64,98–101], and even less contamination is observed following other crops [16,48]. For example, the frequency (% necrotic ears) and the severity (% necrotic spikelets) of the disease on wheat are lower following soybean than following another wheat crop, or worse still, maize [19]. This may be accounted for in two ways. Firstly, soybean crops leave fewer residues than wheat crops, which in turn leave fewer residues than maize crops [7,19,100]. Secondly, the principal *Fusarium* species infecting soybean is *Fusarium sporotrichioides*, whereas wheat and maize are more frequently affected by *F. graminearum* [19], like sorghum [59]. Thus, in addition to the density of residues left by the preceding crop, the nature of the preceding crop is important in determining the pathogen species likely to infect the next crop in the rotation. The preceding crop affects the composition of the pathogen complex throughout the following year. Thus, a preceding crop of potato will allow the development of only *F. culmorum* and *Fusarium sambucinum*, whereas a preceding wheat crop will allow

the development of all *Fusarium* species [62]. It should also be noted that the highest levels of *F. graminearum* contamination are recorded on grains harvested from wheat crops following maize in the rotation, whereas *F. avenaceum* and *F. poae* are the most common species found in grain samples harvested from wheat crops following a crop other than maize [60]. It is therefore advisable to introduce non-host plants into crop rotations, to limit the disease [7]. Indeed, the use of oats as the preceding crop results in a doubling of head blight inoculum in the soil [64,98] even though this crop is unaffected by the disease [14] whereas a preceding crop of sugarbeet, which is hardly affected by *Fusarium*, halves the incidence of the disease in the subsequent wheat crop [14,64,98]. Similarly, flax can be used as a clean-up crop [16], as can alfalfa, after which no disease is observed [102]. However, the quantity of crop residues and the development of pathogens on the preceding crop are not the only explanations of the effect of preceding crop. Wheat crops present different levels of infection depending on whether they follow wheat or durum wheat in the rotation, even though these two preceding crops produce similar amounts of residues and are equally permissive for *Fusarium* development.

Among the other elements possibly involved, the amount of nitrogen in crop residues may affect the possible duration of colonisation by *Fusarium*. Indeed, the high nitrogen content of maize residues may result in a longer period of colonisation of those residues by the fungi, strengthening these fungal populations [2] and favouring disease.

It is also likely that proteolytic soil bacteria, favoured by the low carbon to nitrogen ratio under alfalfa, compete with *Fusarium* species, limiting their development and thus their ability to attack the subsequent crop [62,102]. It should also be noted that, at the end of the cropping cycle, buried cereal stubble provides an ideal substrate for saprophytes, increasing the carbon to nitrogen ratio, possibly resulting in the reappearance of the disease [98].

### 3.2. Effects of soil tillage

The effects of soil tillage are also well known, at least from a qualitative point of view. As for yellow and brown rusts [103], limited soil tillage increases the frequency of head blight [7,19,100], whereas deep tillage (ploughing) decreases it [7,19,64,90,101]. Similarly, limited tillage systems increase the number of *Fusarium* propagules in the soil [14] whereas ploughing decreases inoculum levels [98].

This effect of ploughing may be accounted for in several ways. Ploughing has several direct and indirect effects on the structure [104,105] and microclimate of the soil [105,106] and therefore on the development of fungi [105], notably those of the genus *Fusarium*. Limited tillage and direct drilling systems make it harder to deliver the seed to the required position during sowing, decrease soil porosity, increase structural stability and litter on the surface. The litter layer protects the soil from rain (battering and erosion),

and increases surface humidity (by limiting evaporation), soil temperature and inertia. This layer breaks down into organic matter, enriching the surface soil in carbon and organic forms of nitrogen, and modifying its chemical and biological characteristics. Stores of inorganic carbon increase, the supply of soil mineral nitrogen decreases very slowly and the mineralisation process is delayed. The microbial biomass (bacteria and fungi) increases at the surface and its turnover rate increases in the first 10 cm of soil. Humus is thus less well degraded in this zone, which rapidly becomes more acidic, favouring the development of fungi over that of bacteria. Thus, about 90% of the *Fusarium roseum* population is located in the first 10 cm of soil [98]. Furthermore, the development of this fungus depends on soil aeration [14]. Although this pathogen can survive for 4 years [16] at a depth of 20–25 cm, it is only active and able to develop on plant debris in the first 5 cm of soil [14]. Beyond a depth of 15 cm, the incidence of *Fusarium oxysporum* attacks on carnation decreases as the depth of propagule burial increases [107]. However, this result cannot be readily transposed to other species because *M. nivale* and *F. avenaceum* do not produce chlamydospores [108] and the number of propagules in the soil does not necessarily affect *Fusarium* foot rot levels due to *F. culmorum* [109]. Thus, for certain species, propagules may simply ensure the survival of the fungus rather than serving as an inoculum [98,109].

The development of the *F. roseum* population also depends on the quantity of substrate (crop residues) available [14]. Thus, a decrease in the density of residues on the surface of the soil (for example, after ploughing) helps to decrease the production of inoculum [100,110] and the quantity of spores available for dispersal [109]. This hypothesis seems to be validated by the observation that there are fewer *F. culmorum* propagules if the stubble from the preceding crop is burnt than if it is buried [109]. However, an opposite effect on the disease is observed. Thus, in years in which there are high levels of *Fusarium* infection at the base of the stem, disease levels have been found to be higher if the stubble from the previous crop was burnt than if it was incorporated into the soil [109]. A similar result was previously reported for eyespot [111]. Similarly, the supplementary incorporation of infected stubble not originating from the preceding crop decreases the incidence of *Fusarium* attacks resulting in wheat foot rot to levels below those observed in soils in which the density of residues has not been modified [112]. However, these results may be explained if stubble limits conidium dispersal by splashing, favours growth of the canopy [111], or modifies the infection process. In Yarham's study [111], the addition of stubble did not affect leaf area index, photosynthetic potential or the number of leaves. It also resulted in no decrease in the density of wheat or weeds and had no effect on the size of the plants. All these factors might have facilitated spore dispersal. In the infectious process, four aspects may be affected by the presence or absence of stubble. Firstly, the resistance of the plants may be affected by increases in the amount of silica (SiO<sub>2</sub>) in the leaves of

the wheat plants following the incorporation of additional stubble [112]. The hypothesis that silicon plays a protective role arises from work [103] indicating that this element strengthens cell walls and, particularly, the outer membrane of epidermal cells, increasing resistance to the penetration of pathogen germination tubes in leaves containing large amounts of silicates (shown experimentally for the penetration of *Erysiphe graminis*, which causes powdery mildew on barley) [113]. Similarly, adding silicon decreases *Fusarium* infections and powdery mildew in cucumber [114]. All changes in the structure and microclimate of the soil, the date, method and depth of stubble incorporation also influence the extent and dynamics of crop residue decomposition [105], which may in turn affect head blight levels. Indeed, in optimal conditions of micro-organism colonisation and water and nutrient exchange, the area of contact between the soil and crop residues (affected by the size of the residues and soil porosity) is maximal, accelerating residue decomposition [105]. Consequently, despite providing a larger source of inoculum, stubble incorporation increases the rate of degradation of crop residues, decreasing the duration of colonisation of these residues by pathogens such as *Pseudocercospora herpotrichoides* [110]. These pathogens are thus less well developed, resulting in lower attack rates, which in turn results in slower spore maturation following changes in humidity, light levels or temperature, or lower levels of spore production [111]. Indeed, it is possible that the decomposition of stubble results in the production of substances toxic to fungi or that favour the micro-organisms engaged in stubble decomposition, thereby creating competition between micro-organisms [111], limiting the production of spores. Finally, a study of *Fusarium* foot rot showed that the distribution of crop residues is the primary factor influencing the site of penetration of the fungi [115].

### 3.3. Effects of irrigation

The irrigation of a field influences its microclimate and may encourage the development of the pathogen. Regardless of whether the climate is favourable for the disease in a given year, irrigation increases the frequency (% necrotic ears) and severity (% necrotic spikelets) of the disease over that in non-irrigated plots [19,90].

Uncertainties concerning the survival of the fungus in the soil and its capacity to sporulate in the soil as a function of soil aeration, porosity and light levels, together with the role played by the rate of residue degradation and that of the compounds generated by this process, and their mineral composition (nitrogen, silicon) limit our ability to make quantitative predictions of the effects of the preceding crop, soil tillage or irrigation.

### 3.4. Mineral nutrition

The effects of mineral nutrition on head blight attacks are unclear. As nitrogen applications favour the develop-

ment of the plant, making the canopy more humid, it has often been suggested that such applications are likely to favour the appearance of diseases [103,116]. This has been demonstrated for bunt [103] and blotch or *Septoria* disease [117]. In fact, the severity of *Septoria* attacks on wheat is increased by 11%, which corresponds to a yield loss of 8–9%, following treatment with 100 kg of nitrogen/ha [117]. Nitrogen application significantly increases the incidence of *Fusarium* infection in grains of wheat, barley and triticale [118,119] and the predisposition of wheat to attacks by *F. avenaceum* and *M. nivale* [116]. Similarly, mineral nitrogen applications increase the number of *F. culmorum* propagules [108]. However, in a 2-year study, Teich [90] showed that nitrogen application limited the disease in the first year [99], although this decrease was not confirmed in the second year [100]. Fauzi and Paulitz [120] also demonstrated that disease levels were similar in the presence and absence of applications of 140 kg/ha ammonium nitrate. There are two possible reasons for the uncertainties concerning the effect of nitrogen applications on the disease. Firstly, in certain cases, the applied nitrogen may be poorly distributed in the soil. *Fusarium* foot rot levels have been shown to decrease if ammoniacal nitrogen is applied with a syringe to the tilled layer but not if it is mechanically applied to the field [121]. Secondly, there may be an as yet unidentified link between attacks of *Fusarium* foot rot and head blight [6]. Thus, nitrogen-containing fertilisers may have a different effect on the *Fusarium* head blight and thus affect the production of head blight inoculum. This link may involve competition between the species of *Fusarium* more specific to foot rot (such as *Fusarium solani*) and those more specific to head blight (such as the species of the *F. roseum* group). Indeed, whereas germination of the conidia of *F. solani* is decreased by nitrate application, spores of the species of the *F. roseum* group use all forms of nitrogen [122].

Different forms of nitrogen have different effects. Urea appears to reduce head blight levels more than ammonium [90,123]. Teich [90] suggested three hypotheses to account for this difference between urea and ammonium: (i) the urea may decrease the size of the *Fusarium* population because nitrite blocks reproduction in these fungi and inhibits the formation of chlamydospores [124]; (ii) urea may prevent the maturation of *Fusarium* ascospores, as it does for those of *Venturia inequalis* [125]; and (iii) urea may increase the number of actinomycetes in the soil [122,126], these microbes being antagonists of *F. graminearum* [126] and *F. oxysporum* [122]. Furthermore, rotting of the base of the stem and of the roots is more severe if nitrogen is applied in an ammoniacal form than as nitrate [121,122,127]. This may also result from the higher rate of germination of *F. solani* (which may cause foot rot) in the presence of ammoniacal nitrogen than in the presence of nitrate [122].

In contrast to what was observed for bunt [103], the application of phosphorus has been shown to limit foot rot [128] and head blight [99]. However, the result obtained for head

blight was not confirmed in the second year of the study [100].

Potassium application decreases transpiration by causing stomatal closure, thereby helping to decrease the humidity of the air. Thus, the application of potassium limits the germination of rust spores [103]. Furthermore, high levels of potassium favour the synthesis of high-molecular-weight compounds (such as cellulose), decreasing the availability of nutrients to the pathogens and increasing mechanical resistance to parasite penetration [103]. However, potassium applications do not appear to affect the incidence of head blight [100].

To understand the meaning of these contradictory results, we need to bear in mind that the effect of fertiliser applications depends on two factors: the age of the plant and the balance of mineral elements. Indeed, foot rot levels are decreased by early applications of nitrate but increased by late nitrate applications [128]. Conversely, foot rot levels are increased by early potassium applications and decreased by late potassium applications [128]. Moreover, the application of manures with a poor nutrient balance leads to more severe foot rot symptoms [14,64]. Antagonism between nitrogen and potassium is generally reported [14,103]: excess potassium and nitrogen deficiency render the plant more resistant whereas potassium deficiency and excess nitrogen render it more susceptible. This antagonism results from the fact that potassium increases nitrate absorption [122]. The nitrate absorbed activates nitrate reductase, leading to the accumulation of amino acids [127]. These amino acids are used in the synthesis of organic nitrogenous compounds [122] and of high-molecular-weight compounds [103]. These compounds, like cellulose, contribute to the resistance of plants to diseases by increasing mechanical resistance to parasite penetration and by decreasing the quantities of soluble amino acids and low-molecular-weight carbohydrates, which serve as nutrients for these pathogens [103]. Soluble amino acids and low-molecular-weight carbohydrates are produced by increasing the activation of nitrate reductase in the presence of excess nitrate, by activating enzymes such as amylase, proteases and glucosidases, and by decreasing phosphorylation in conditions of potassium deficiency [103]. This increases the intracellular concentration of these compounds [103], favouring the development of pathogens.

Maize plants are most resistant to diseases when sugar concentrations are high [129]. Sugar levels are inversely proportional to nitrogen supply and directly proportional to potassium supply [14]. Conversely, if we consider three, rather than two, mineral elements, the mineral balance least favourable for the development of foot rot in wheat, both in seedlings and in adult plants, is high levels of nitrogen and potassium and low levels of phosphorus [128].

Several studies have demonstrated the existence of a relationship between the mineral and organic composition of the soil and the development of soil micro-organisms, which may antagonise or stimulate the development of *Fusarium*. Thus, applications of organic fertiliser rich in nitrogen, par-

ticularly the ammoniacal and nitrous acid forms, significantly reduce (by a factor of 1000) the size of the populations of many soil pathogens and markedly increase the size of populations of soil micro-organisms [123]. Furthermore, a mixture of ammoniacal nitrogen and ammonium is recommended to increase the capacities of *Pseudomonas fluorescens* populations, thereby favouring the development of the plant (as this bacterium is a rhizobial bacterium) and inhibiting the development of *Fusarium* [130]. An application of glucose (simulating root exudates) to soils containing chlamydo-spores of *F. oxysporum* and *F. solani* favours the germination of these spores and the development of their germination tubes [131]. A similar result was also reported in a previous study: wheat root exudates increase the number and length of germination tubes arising from the spores of *F. roseum* and *M. nivale* [98]. The effect of glucose application is even greater if the soil is nutrient-poor, especially for slow-growing species such as those of the genus *Fusarium* [132].

The mineral nutrition of plants and the development of micro-organisms in the soil also depend on soil pH. The conidia of *M. nivale* do not germinate in culture in vitro if the pH of the medium is lower than about 5 [11]. However, pH has been found not to affect the incidence of the disease [99,100].

### 3.5. The effect of sowing date

Sowing date is another element of crop management that has an indirect effect on the production of, and infection by spores, because it partly determines flowering date, together with the variety sown and climate. If the sowing date is such that flowering coincides with spore release, then more frequent and severe attacks are likely. This hypothesis is based on the fact that the anthesis is the stage in wheat at which the consequences of pathogen attack are thought to be the most severe [12,16,86,87].

The effect of sowing date should therefore be considered with respect to the level of attack as a function of the earliness of the variety. Early-maturing wheat cultivars tend to be more resistant to head blight than cultivars that mature later [133]. The duration of the growth period in wheat has a significant positive effect: the longer the cycle of the variety, the lower the degree of contamination observed [134]. As this effect is not observed in barley and oats, Couture [134] suggested that the threshold number of days exceeds the length of the cycle for wheat, but not for barley and oats. However, conflicting results were obtained in other studies: resistance to head blight has been shown to be independent of maturity factors [135], and late sowing has been shown to favour the development of head blight whereas early sowing favoured the development of foot rot [16]. The results obtained almost certainly depend on the climate of the region concerned and the variety grown. Flowering period and the duration of the growth period for a given variety probably depend essentially on the year and region concerned:

the only valid way to determine the characteristics (period and duration of flowering and growth duration) of varieties adapted to a given region is to carry out a frequency analysis of the climate, which requires the monitoring of head blight attacks in a given region over many years. Sowing on several dates (to extend the flowering period) should make it possible to limit the risk of heavy contamination in all the fields. A frequency analysis in a given region may also provide useful information for the optimal choice of sowing date.

### 3.6. Effects of canopy density

If the inoculum is dispersed primarily by splashing, the density of the canopy is an important factor as it may place obstacles in the way of this dispersal. Thus, a low canopy density can favour spore dispersal (by creating fewer ob-

stacles). In the case of high canopy density, due to nitrogen fertilisation and/or higher sowing density and/or smaller spaces between rows of wheat, two opposing effects may be observed. Firstly, the high density is likely to increase the humidity of the canopy [116], favouring spore germination, as has been observed for rusts [103]. Alternatively, the high density of the canopy may increase the number of obstacles, limiting the vertical dispersal of spores towards the ear. However, for *Fusarium* infections, more severe attacks of foot rot [16] and head blight [5] have been reported in cases of high population density: more than 350 grains sown/m<sup>2</sup> [16].

Plant population density may also be increased by weed infestations. In the presence of a large weed population, the number of species of *Fusarium* causing head blight in wheat increases, as does the intensity of the disease [1].

Table 2  
Spectrum of infection of weeds by *Fusarium* species

Weed host		<i>Fusarium</i> Species			Reference
Family	Latin name	Common name		Site and form	
Poaceae Mg	<i>Agropyron</i>	Wheatgrass	Not indicated	Not indicated	[85]
Liliaceae M	<i>Allium</i>	Garlic	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	Not indicated	[64]
Poaceae Mg	<i>Alopecurus myosuroides</i> Huds.	Blackgrass	<i>F. roseum</i>	In the seed	[48]
Poaceae Mg	<i>Avena fatua</i> L.	Wild oats	<i>F. roseum</i>	Lesion, spores on leaves and seeds	[48]
Chenopodiaceae D	<i>Beta vulgaris</i>	Wild beet	<i>F. culmorum</i>	Stem base	[62]
Cruciferae D	<i>Capsella bursa-pastoris</i> L.	Shepherd's purse	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sambucinum</i>	Stem base	[62]
Compositae D	<i>Cirsium arvense</i> L.	Thistle	<i>F. avenaceum</i>	Stem base	[62]
Poaceae Mg	<i>Dactylis</i> L.	Cocksfoot	<i>F. roseum</i>	Lesion on straw, stem base, increase with N	[14,48]
Poaceae Mg	<i>Echinochloa crus-galli</i> L.	Barnyardgrass	Not indicated	Not indicated	[85]
Poaceae Mg	<i>Festuca</i>	Fescue	<i>F. roseum</i>	Stem base, increase with N	[14]
Rubiaceae D	<i>Galium aparine</i> L.	Cleavers	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i>	Stem base	[62]
Poaceae Mg	<i>Lolium multiflorum</i> L.	Ryegrass	<i>F. roseum</i>	Lesion on straw, stem base, increase with N	[14,48]
Compositae D	<i>Matricaria spp.</i>	Mayweed	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. sambucinum</i>	Stem base	[62]
Ranunculaceae D	<i>Ranunculus acris</i>	Common buttercup	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i>	Stem base	[62]
Ranunculaceae D	<i>Ranunculus repens</i> L.	Creeping buttercup	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i>	Stem base	[62]
Polygonaceae D	<i>Rumex obtusifolius</i>	Dock	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i>	Stem base	[62]
Compositae D	<i>Senecio vulgaris</i> L.	Groundsel	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i>	Stem base	[62]
Caryophyllaceae D	<i>Spergula arvensis</i> L.	Corn spurrey	<i>F. sambucinum</i>	Stem base	[62]
Carophyllaceae D	<i>Stellaria media</i> L.	Chickweed	<i>F. avenaceum</i>	Stem base	[62]
Fabaceae D	<i>Trifolium</i>	Clover/trefoil	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	Not indicated	[64]
Urticaceae D	<i>Urtica dioica</i> L.	Nettle	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sambucinum</i>	Stem base	[62]
Scrophylariaceae D	<i>Veronica persica</i>	Speedwell	<i>F. graminearum</i>	Stem base	[62]
Violaceae D	<i>Viola arvensis</i> Murray	Field violet	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sambucinum</i>	Stem base	[62]
Cryophyllaceae D	<i>Dianthus</i>	Carnation	<i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i>	Not indicated	[64]

M: monocotyledonous; g: grasses; D: dicotyledonous.

This may be accounted for by the number of common field weeds (both dicotyledonous and monocotyledonous weeds) on which numerous species of *Fusarium* have been detected [62]. Table 2 lists the various weeds known to serve as hosts for *Fusarium*, and the species of *Fusarium* found on them.

The “host plant” nature of these weeds [14,48,62,98] suggests that they constitute a potential source of inoculum. Since 1950, grass weeds have been suspected to act as a source of inoculum whereas other weeds have been thought to favour infection in a different way, by modifying the microclimate, increasing heat and humidity [136].

Whatever the role played by the various weed families, the decrease in the incidence of the disease following the use of herbicides suggests that weeds do have an effect [99]. However, different results were obtained in the following year of the same experiment [100]. This difference probably results from interactions between cultural practices and weeds. For example, the withering of forage grasses (fescue, cocksfoot, ryegrass) due to *F. roseum* increases with the dose of nitrogen applied [14].

### 3.7. Effects of infestation of the canopy by bioaggressors others than fungi responsible for the head blight

The term “canopy” is often used to describe the green canopy, consisting of healthy plants. Diseases, particularly foliar diseases, decrease the area of the plants capturing light, thereby limiting the development of the crop. Very few studies have focused on the competition between pathogens or between diseases. Only two authors have analysed the effect of a powdery mildew attack on head blight, and the results of these two studies conflicted. In the first study, powdery mildew attacks were found to have a positive effect on head blight attacks [30] whereas in the second, no effect was observed [99]. These conflicting results may be accounted for by several factors, such as climatic conditions, the varieties cultivated and the intensity of the diseases in these studies.

In addition to soil micro-organisms (discussed in Section 3.2), the ear micro-organisms play a role, notably in biological control [137]. Indeed, the plant may be protected against pathogen attacks by prior inoculation with pathogen isolates of various degrees of virulence, which is known to induce resistance in cases in which protection requires activation of the host’s defence responses [138]. Thus, inoculation with *Microsphaeropsis* spp. significantly decreases the production of *F. graminearum* ascospores on wheat and maize ears and, to a lesser extent, on wheat and maize residues [137,139]. This decrease is particularly large if the residues are inoculated early with *Microsphaeropsis* (test with inoculation 2 weeks before the *F. graminearum* attack and 4–6 weeks after it) [137]. Prior inoculation with *Phoma betae* or *Pythium ultimum* decreases the severity of head blight on wheat and extends the incubation and latent periods of the disease due to *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae* and *M. nivale* [138]. Such prior inoculation also significantly increases the number of grains per ear and decreases the

number of *Fusarium* isolates obtained from the harvested grains [138]. A previous study [140] showed that contact between *Pythium oligandrum* and *F. culmorum* macroconidia led to coagulation and a loss of cytoplasm, followed by complete degradation of the walls of the macroconidia and the production of *P. oligandrum* oogonia in abundance on the parasitised macroconidia. Inoculation of wheat ears with *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* or *Cladosporium herbarum* at GS69 (Zadoks growth scale [141]) favours the infection of ears inoculated with *F. culmorum* at GS65, whereas prior inoculation, at GS59, decreases infection of the ears by *F. culmorum* [142]. Following the demonstration of antagonism between these saprophytes, Liggitt et al. [142] suggested that *A. alternata*, *B. cinerea* and *C. herbarum* produce volatile antibiotic substances that limit the growth of *F. culmorum*, consistent with the decrease in size of *F. culmorum* colonies observed following prior inoculation with other saprophytes.

Such antagonism is also observed between *Fusarium* species [22,27] and between species of *Fusarium* and *Microdochium* [22]. This is the case, in particular, for fungicide treatments acting against only one of these genera, resulting in the development of the unaffected genus to a greater extent than in the absence of treatment, when the two genera compete [21,22]. Similarly, prior inoculation with germination fluid from *F. avenaceum* predisposes wheat ears to infection by conidia of *F. avenaceum* or *M. nivale*, but not by conidia of *F. culmorum*, or *F. poae*. Other germination fluids were found to have no such effect [138]. This suggests that diffuse substances present in the germination fluid of *F. avenaceum* promote the production in competitive host tissues of resistance factors specific for *F. avenaceum* and *M. nivale* [138].

### 3.8. Effects of chemical treatments

The efficacy of fungicide treatments for head blight is variable, and difficult to predict. It depends not only on the active ingredient but also on the method and date of application of the fungicide [6,27]. If a fungicide treatment is to be effective, it must be applied several days before the attack and entirely cover all the ears [142]. Efficacy also depends on the interaction between fungal development and climate [143], the virulence of the pathogenic strains [143] and above all, the parasite complex present on the plot of land concerned [6]. Each of the fungal species implicated in head blight has a specific fungicide susceptibility profile: *F. graminearum* is particularly susceptible to triazoles whereas *F. avenaceum* is more susceptible to strobilurins. *F. roseum*, a complex consisting of *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. avenaceum*, is much more susceptible to triazoles than is *M. nivale*, which is essentially susceptible to strobilurins [22]. Triazole fungicides containing tebuconazole are currently the most effective [21,27,143].

Chemical treatments may have an effect by modifying the height of the canopy. For a single variety grown in a sin-

gle year, in a single region, the use of plant growth regulators (primarily gibberellin inhibitors) results in more severe head blight attacks [14,64,118,120]. This is presumably because plant growth regulator treatment results in the ears being closer to the soil, and therefore to the crop residues (source of inoculum), facilitating the dispersal of the spores to the ear (by splashing in particular). Indeed, the distance of the ear from the soil is a factor for resistance by avoidance in cultivars. Plant growth regulators also affect the microclimate of the crop residues on the soil [120], possibly increasing the production of perithecia and ascospores.

#### 4. Effects of various cultural practices on the production of mycotoxins by *Fusarium*

The effects of cultural practices on the intensity and severity of head blight symptoms are well documented, at least for certain practices, but far fewer studies have considered the effects of these practices on mycotoxin production.

##### 4.1. Mycotoxins produced by *Fusarium*

Fungi of the genus *Microdochium* are currently considered not to produce toxins [8] and will therefore not be dealt with in this section. It should also be noted that studies on the mycotoxins produced by *Fusarium* have generally focused on deoxynivalenol, even though *Fusarium* also produces other types of mycotoxin. Fig. 2 presents the chemical structures of the main mycotoxins produced by *Fusarium*. Deoxynivalenol belongs to the trichothecene family, which contains two types of toxin: type A and type B. Type A toxins include toxins T2, HT2, diacetoxyscirpenol (DAS) and scirpenol [39], which act on the initiation of protein elongation [144]. Type B corresponds to deoxynivalenol (or vomitoxin) and its acetyl derivatives—3-acetyldeoxynivalenol (3acDON) and 14-*O*-acetylDON-4—nivalenol (NIV) and verrucarol [39]. The toxins of this group act on the elongation and termination steps of protein synthesis [144]. Trichothecenes are toxic to all organisms. In mammals, the absorption of trichothecenes leads to blood and digestive disorders. In humans [145], burning sensations in the mouth and stomach, headaches, a decrease in red blood cell count, bleeding, necrosis of the throat and stomach and, in some cases, death, were observed in a humanitarian catastrophe in the USSR between 1942 and 1947 caused by the ingestion of wheat that had suffered foot rot all winter [38,39]. The production of trichothecenes is favoured by cold and humidity [146] and studies on various organisms have demonstrated the toxicity of these substances. In animals, vomiting is observed after the ingestion and absorption of at least 10 mg deoxynivalenol/kg, together with irritation of the mucous membrane lining the mouth and the oesophagus, with animals refusing to eat after ingesting 2 mg deoxynivalenol/kg.

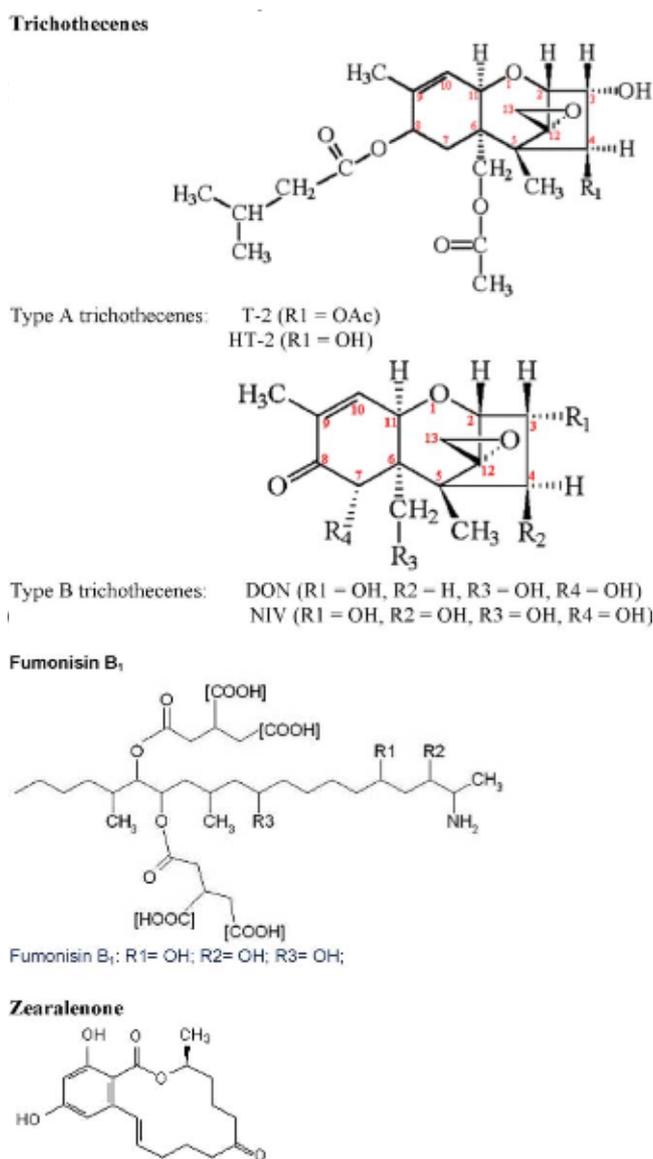


Fig. 2. Chemical structures of trichothecenes, fumonisin B1 and zearalenone.

In plants, deoxynivalenol retards the germination and growth of wheat, and inhibits the growth of the grain and the coleoptile tissues [147]. The phytotoxicity of mycotoxins is generally estimated by means of coleoptile elongation tests [43,145]. In adult plants, deoxynivalenol seems to circulate in the phloem, with the concentration of this molecule in the plant following a descending gradient from the rachis, through lemmas and grains to the peduncle [148]. In addition, from the fourth day after inoculation, the flower parts, rachis and peduncle contain larger amounts of deoxynivalenol below the point of infection than above it [149]. *Fusarium* can also produce mycotoxins of two other families: fumonisins, which are recognised carcinogens [13,150] and zearalenone. Zearalenone belongs to the oestrogen family. It perturbs reproductive hormone equilibrium and alters secondary sexual characters [145]. Pigs are particularly sen-

sitive to this toxin [145]. In the laboratory, it has been shown that this compound also controls reproduction in the fungus that produces it, by regulating perithecium production [151–153]. No phytotoxic effect of zearalenone has been observed in coleoptile elongation tests [145].

To account for the small number of studies dealing with the mycotoxins produced by *Fusarium* on wheat, it should be borne in mind that most of these studies have been carried out in Europe and North America, where type A trichothecenes are rarely detected [154]. Furthermore, fumonisins and zearalenone are found essentially on maize [8,155]. In addition, zearalenone is considered to be only mildly toxic to humans [155].

#### 4.2. Effect of soil tillage

Soil tillage seems to have similar effects on the production of mycotoxins and on the disease itself (see Section 3.2). Unlike chisel ploughing and direct drilling systems, mouldboard ploughing decreases the concentration of deoxynivalenol in the grains [19,101,156]. In one study, a significant positive correlation between deoxynivalenol concentration and the intensity of soil tillage (ploughing or direct drilling) after a maize crop was observed [100]. Similarly, another study comparing three cropping systems involving ploughing (productive, integrated and organic) with a direct drilling system over 2 years reported that levels of deoxynivalenol, zearalenone and nivalenol contamination were highest for the direct drilling system [55].

#### 4.3. Effect of the preceding crop

The effect of the preceding crop is also similar for disease symptoms and deoxynivalenol concentration. Deoxynivalenol concentration in wheat is 25% lower after a soybean crop than after a wheat crop and 49% lower after soybean than after maize [19]. Wheat following maize in the rotation has been found to have deoxynivalenol concentrations six times higher than those in wheat following another cereal (wheat, barley) or soybean [100]. In direct drilling systems, wheat crops following an oilseed rape crop contain 90% less deoxynivalenol than wheat crops following a maize crop [101]. As for soil tillage, only few studies have produced useful results.

#### 4.4. Effect of mineral nutrition

We saw in Section 3.3 that the effects of mineral nutrition on the disease are unclear. In contrast, there are fewer strong contradictions concerning the effect of mineral nutrition on mycotoxin production. This is probably because very few studies have focused on this question. Increases in nitrogen input from 0 to 80 kg/ha, result in increases in grain deoxynivalenol content; at levels above 80 kg/ha, a small but significant decrease was observed [119]. Urea-based fertilisation resulted in lower levels of deoxynivalenol in wheat grains

than did ammonium nitrate in 1997, but this result was not observed the preceding year, in which no effect had been demonstrated [156]. Applications of ammonium nitrate–urea solution and nitramoncal did not give significantly different results [119]. Potassium, phosphorus and pH did not appear to affect deoxynivalenol concentration significantly [100]. A laboratory study showed that  $Mg^{2+}$  ions inhibit the elements responsible for inducing trichothecene synthesis [38].

These studies were empirical, and were not based on any particular assumption concerning the mechanisms involved. It therefore remains difficult to extrapolate the results obtained.

#### 4.5. Effect of variety earliness

Very few studies have focused on the effect of wheat variety earliness on the production of mycotoxins. The earliest varieties seem to accumulate more deoxynivalenol than do late-flowering varieties [157], possibly due to varietal differences but more probably due to greater coincidence of the phase of maximum susceptibility in plants with the period most favourable for spore dispersion. This trend appears to be based on the relationship between the severity of the attack and the intensity of toxin contamination. The choice of variety is therefore of key importance for combating the accumulation of toxins in the grains [158].

#### 4.6. Effect of fungicide treatments

The application of a triazole fungicide, such as tebuconazole, decreases levels of deoxynivalenol contamination in artificially inoculated crops with respect to those observed in untreated controls [21,27,28,143]. However, conflicting results have been obtained [22]. More generally, in conditions of natural contamination, the application of fungicides does not significantly decrease the concentrations of deoxynivalenol and nivalenol and there is not necessarily a correlation between the application of fungicides and the quantity of deoxynivalenol and/or nivalenol found in the grains [6,55]. This may be accounted for by the multitude of species present in fields and the relative specificity of fungicide treatments for only one or a few species. Another hypothesis has also been put forward: too low a dose of fungicide may stimulate the production of deoxynivalenol by *Fusarium* in wheat grains [53].

This analysis shows not only that few studies have investigated the effects of cropping systems, but also that the characterisation of the disease in these studies is often severely flawed. This makes it difficult to extrapolate and to interpret the results. To understand the relationship between cropping systems and mycotoxin production, we therefore need to break down this relationship into two parts: the effects of cropping systems on the disease (symptoms, nature of the pathogenic agent) (Section 3) and the relationship between the disease and the production of mycotoxins, which may itself vary as a function of cropping system.

## 5. Relationship between the disease and toxin production

### 5.1. Toxin production by the fungi

Toxin production in fungi is controlled by many factors. One of the most important factors intrinsic to the fungus is the genetic capacity of the pathogenic strain to produce toxins, in terms of the quantity and type of toxins produced [34,159,160,161]. Thus, strains of *F. graminearum* may, like *F. culmorum*, produce isomers of monoacetyldeoxynivalenol or alternatively, like *Fusarium crookwellense*, may produce acetyl derivatives of nivalenol [4]. Strains of *F. sambucinum* may produce the T2 toxin whereas those of *F. sporotrichioides* produce diacetoxyscirpenol [4]. It should be noted that strains of *F. graminearum* [60,159,162] and of *F. culmorum* [163,164] tend to produce either deoxynivalenol or nivalenol, but not both. Thus, the two toxins are generally not produced by the same strains, although the two types of strain often coexist in the same field [165]. Moreover, regionalisation of the types of strain at world level is observed for *F. graminearum* strains producing 3-acetyldeoxynivalenol and those producing 15-acetyldeoxynivalenol, with strains producing 3-acetyldeoxynivalenol predominating in Europe, China, Australia and New Zealand whereas those producing 15-acetyldeoxynivalenol predominate in the US [159]. Data for a collection of 188 strains of *F. graminearum* indicated that European and American strains produce essentially deoxynivalenol and are more aggressive than Nepalese strains, which produce either deoxynivalenol or nivalenol [166]. A negative correlation has been found between the production of zearalenone and that of trichothecenes (deoxynivalenol or nivalenol) by the spores of *F. graminearum* [52]. This appears to indicate that the production of these toxins shares a common control process, which may play an important role in the ecology of *F. graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* [52].

Other factors may also cause variations in toxin formation. These factors include the substrate, the period of colonisation of the substrate by the strain, competition between micro-organisms [2,34,52,53], interaction between the pathogenicity of the strains and the wheat variety [167,168] overall climatic conditions [51] and, more particularly, temperature [2,52–54], humidity [2,52,53] and rainfall [54].

Other poorly understood factors extrinsic to the fungus also operate. For example, the protein to carbohydrate ratio, which is important in mycotoxin synthesis [169], may play a role. However, Bakan [38] showed that toxin formation is not necessarily controlled by food stresses and is not necessarily linked to the growth of the fungus.

This last point is particularly important because many authors have suggested that the trichothecenes (deoxynivalenol in particular) produced by *Fusarium* species play a role in the aggressiveness or virulence of certain isolates [164,170–174]. Indeed, certain mutants deficient in de-

oxynivalenol are less aggressive on wheat than the original strain [175]. Similarly, the least virulent mutants of *F. graminearum* in terms of plant colonisation are those unable to produce deoxynivalenol or nivalenol (mutations in the Tri5 gene, involved in trichothecene production) [171]. Thus, trichothecenes are considered to be virulence factors in *F. graminearum*, during the infection of wheat [145,175], and in *F. culmorum*, during the infection of barley [164].

In conditions of artificial contamination with a given pathogenic strain or in natural contamination conditions, several authors [19,27,90,100,147,164,176,177] have observed a significant, positive correlation between the incidence and/or severity of the disease and deoxynivalenol concentration (also reported by Bai et al. [49] for 116 wheat lines). Others [26,49,178,179] have demonstrated a significant correlation between deoxynivalenol concentration and the fungal biomass of the grains (measured by assessing the amount of ergosterol). These results suggest that new cultivars could be selected on the basis of symptoms to ensure low levels of deoxynivalenol. However, exceptions were found among these lines: certain cultivars present severe symptoms with low deoxynivalenol levels, particularly those with moderate resistance to propagation of the pathogenic agent [49]. Thus, the production of deoxynivalenol is not essential for the infection of grains [164]. Furthermore, after the inoculation of five wheat varieties with a strain of *F. graminearum*, no correlation was observed between deoxynivalenol concentration and the severity of infection [172]. Similarly, after inoculation with a complex of species, no correlation was observed between deoxynivalenol concentration and infection on wheat, barley or oats [178]. In conditions of natural contamination, no correlation has been found between the intensity of the disease on wheat and the concentration of deoxynivalenol [53,55,78], or between the presence of *Fusarium* and the concentration of deoxynivalenol [154]. This lack of relationship is also observed with other toxins, such as nivalenol [55]. A similar result was obtained with maize: after inoculation of the ear with *F. poae*, no relationship was found between the severity of the disease and toxin (nivalenol and fusarenon X) production [180]. These differences in results may be due to the ranges of variation tested and the comparisons made not being the same. Some comparisons were made in the field and others in the laboratory; some were made after artificial inoculation with one or several species and others were made in natural contamination conditions.

The date of the attack and the species involved also affects the relationship between symptoms and toxin levels. Indeed, it is only to be expected that as the number of affected grains increases, so does the risk of major contamination by mycotoxins. However, a late attack may prevent the disease from reaching a high level of severity, even if very high levels of mycotoxins are produced. Thus, fungi and mycotoxins are detected before any visual symptoms of disease [148,181]. In addition, not all the species of the parasite complex responsible for head blight produce mycotoxins:

*Microdochium*, for example, does not produce mycotoxins. Similarly, even among *Fusarium* species potentially capable of producing toxins, strains unable to produce toxins have been identified [2,38,162,182]. Other strains have been identified that produce far more toxin than the mean amount for all strains [183]. In addition to climate (particularly rainfall levels and temperature before and at flowering), the species profile of the fungi responsible for head blight also depends on agronomic factors such as soil tillage, nitrogen fertilisation, fungicide use, crop rotation and host genotypes [10]. Furthermore, the species of *Fusarium* potentially able to produce toxins cannot necessarily produce trichothecenes (the most studied mycotoxins) [183]. These observations indicate that it is possible for the plant to present symptoms in the absence of toxin production. However, the conditions of toxin productions in the field remain mostly unknown.

The relationship between the intensity or severity of symptoms and toxin production also depends heavily on the type of resistance carried by the plant. The severity of symptoms is known to depend heavily on plant resistance: certain genotypes limit the development of the mycelium in the grain, protecting the grain against degradation and limiting the visual signs of attack, but are not very tolerant of mycotoxins, with very high mycotoxin levels being recorded [49]. Conversely, other types of cultivar may present severe symptoms with only low mycotoxin levels [49].

## 5.2. Different mechanisms of genetic resistance to *Fusarium* head blight in plants

### 5.2.1. Non-specific resistance

It is not easy to identify cultivar resistances because the species of *Fusarium* responsible for head blight are saprophytes with a broad host-range and low levels of intraspecific variation, which is not the case for pathogens in general [6,18]. It should also be noted that all cultivars are susceptible to some extent, with even the least susceptible cultivars displaying only moderate resistance [16,49,50]. Resistance to the development of the fungus and to the accumulation of trichothecenes is probably controlled by different genes [43].

### 5.2.2. Heritability of the resistance

The low specificity of *Fusarium* and *Microdochium* generates polygenic resistance in the plant, involving genes with various degrees of dominance [43,184]. It is the combination of these genes, controlled by the environment [176] that results in genetic resistance in the plant [13].

The inheritance of resistance can be described by a dominance-additive effect model, in which the additive effect is the essential factor (results based on diallel analyses) [9,25,185]. Several studies [18,25,186–188] have demonstrated the existence of resistance genes on 18 of the 21 chromosomes (1B, 2A, 3, 3B, 4B, 5A, 6B, 6D, 7A, 7B, etc.). Three pools of genes are responsible for three different genetic constitutions conferring different types of

resistance to head blight in wheat: in Eastern European winter wheats, in Japanese and Chinese spring wheats and in Brazilian and Italian spring wheats [189]. The most commonly used source of resistance is undoubtedly Sumai 3 (in China), in which stable resistance is combined with valuable agronomic characteristics (yield potential and resistance to rusts and powdery mildew) [18,43,190]. The resistance of this genotype, like that of Frontana (a Brazilian variety) and Nobeokabouzu-komugi (a Japanese variety)—the two other major sources of resistance—is based on two or three genes with additive effects, the sensitivity of which varies with a multitude of minor genes [9,18,191]. The crossing of Frontana and Sumai 3 resulted in the detection of two major quantitative trait loci (QTLs) [13]. These sources of resistance are of great potential value for future crosses and the selection of new cultivars because they are stable.

Resistance to head blight in wheat is horizontal (non-specific) and thus protects against all species of *Fusarium* and *Microdochium* [6,18,43,192]. No correlation has been found between seedling resistance and resistance in the ear. Thus, a given cultivar may be susceptible at the seedling stage and resistant at the adult stage or vice versa. Alternatively, it may be susceptible throughout the crop cycle [5]. The activation of resistance genes during an attack depends on the developmental stage of the wheat, varying throughout the crop cycle [5,47,49,50,90]. Peak toxin accumulation also depends on the cultivar grown [193]. Finally, it should be noted that the duration of the induction period and the intensity of the response to the defence mechanisms induced also determine the defence of the plant [43]. Tetraploid wheats are more resistance to head blight than are diploid wheats [194].

The defence or resistance mechanisms of the plant depend not only on growth stage, but also on the humidity and temperature of the air [47] and on the genetic capacity of the wheat cultivar [5,18,49,50,90]. However, no plant host defence reaction has ever been detected macroscopically or histologically on the outside of the glumes [12]. In addition, no cellular or anatomical characteristics [13,50] or histological features [50] have been found to be associated with resistance or susceptibility. However, the techniques currently used, and ultrastructural studies in particular, have shown that susceptible and resistant wheat varieties react differently to infection and to the propagation of pathogens [94].

This implies the existence of multiple mechanisms of defence or resistance in plants, both active (including physiological processes) and passive (including morphological characteristics such as avoidance), and/or tolerance [5]. Five types of cultivar resistance are currently known and described.

### 5.2.3. Types of resistance

5.2.3.1. *Type I: resistance to initial infection* [50]. Many cultivars may be resistant to initial infection. According to Nakagawa [195], this type of resistance is controlled by

dominant genes at three loci subject to epistasis. This type of resistance may be passive or active.

*Passive mechanisms* involve morphological characteristics facilitating avoidance, making it possible for the plant to decrease the severity of the disease. The receptiveness of cultivars to the disease is lower in cultivars with awns [5,14,134], regardless of varietal differences in resistance [134]. Similar results have been obtained with wheat, barley [134] and oats [45,134]. Similarly, the height of the ear and its angle with respect to the stem are negatively correlated with the severity of head blight and the accumulation of deoxynivalenol [191]. The receptiveness of cultivars to *Fusarium* and/or *Microdochium* is also lower for ears with a large peduncle—at least 15 cm between the flag leaf and the ear [5]—and/or without growth arrest, reducing the area in contact with the conidia and the duration of grain humidity [5]. A cultivar well adapted to its environment is also a criterion for resistance to head blight [18,43]. Indeed, a canopy with too many ears [5,16] or a flowering season that lasts too long [2,90] is likely to result in slightly higher susceptibility to the disease. The resistance of a variety may be evaluated as a function of the duration of time for which the flowers remain open and of the percentage of flowers presenting autogamous flowering (unopened anthers) and allogamous flowering (opened anthers) [50]. Studies have shown either that resistance to head blight may be maximised by the use of early varieties [133] or that earliness has no importance [135]. However, the importance of this factor seems to depend on the date of the attack and, thus, on the year and region studied. Similarly, only one study has investigated the effect of flowering date on mycotoxin contamination: the time of infection by *F. culmorum* that produces the greatest amount of deoxynivalenol contamination is restricted to a short period during anthesis [87]. However, like disease, flowering period and variety growth duration probably depend essentially on the year and region concerned: the only valid way to determine the characteristics (period and duration of flowering and growth duration) of varieties adapted to a given region is to carry out frequency analysis of the climate, which requires the monitoring of mycotoxin contamination in a given region over many years.

It is widely accepted that morphological characteristics are less important than the possible physiological resistance of cultivars [9]. This physiological resistance includes all the other possible mechanisms. *Active mechanisms* include defence reactions concerning the physiological qualities of the cell that limit colonisation of the plant by the fungus, such as the activation of enzymes degrading the fungal cell wall. Such a mechanism has been proposed for pathogenesis-related (PR) proteins and hordothionins [196]. Mechanisms of this type may account for the induction of several defence genes 48 h after inoculation, including genes encoding chitinases, glucanases, peroxidases and thaumatin-like proteins (TLP) [197,198].

The endo- and exochitinases in plant cell walls help to improve plant resistance by hydrolysing chitin, a protective polysaccharide present in the cell walls of the pathogens [18,199]. The various types of chitinase known do not have the same effects [200]: the class I chitinase-a of rice strongly inhibits re-extension of the hyphae and is present in mature cells in particular. It collects at the tip of the hyphae, on the lateral walls and in the septa and has a very high affinity for fungal cell walls. This enzyme releases a large amount of reducing sugar from the fungal cell walls. It also ligates the lateral walls and the septa, is part of the walls of mature cells and degrades mature chitin fibres. In contrast, the class II chitinase-c of rice is found essentially at the tip of the hyphae, which it ligates before degrading young chitin fibres. Thus, chitinase-a is more effective than chitinase-c at inhibiting the growth of the fungus [200].

The antimicrobial activity of thionins is attributed to their capacity to create pores in the membranes of fungi by means of interactions between the phospholipids and phosphoinositides of the membrane or by decreasing the activity of enzymes by reducing disulphide bonds [199].

Thaumatococin-like proteins may have two modes of action: they may be specifically produced in response to the presence of pathogenic fungi in a certain number of plants, including wheat [201] or they may disturb the signal transduction cascade in the cell, increasing tolerance to trichothecenes and favouring the development of fungi in the plant [198]. A trypsin-like protease produced by *F. culmorum* may be one of the key enzymes in the colonisation of plants by the fungus [202]. Indeed, the presence of this enzyme in barley has been shown to be correlated with the degradation of specific buffer proteins in infected grains [203]. The alkaline protease produced by *F. culmorum* is also involved in the colonisation of barley and wheat grains [204]. Peroxidases (POX) are oxidoreductive enzymes involved in the construction of the cell walls of plant hosts (phenol oxidation, suberisation, lignification) during defence reactions against pathogenic agents [205]. The concentration of POX increases significantly during the milk stage in wheat anthers inoculated with *F. graminearum*, whereas this is not the case in healthy wheat [205].

Polyphenol oxidases (PPO) are involved in the oxidation of quinone polyphenols (a microbial component) and in the lignification of plant cells during microbial invasion [205]. The specific activity of PPO is maximal during the milk stage in wheat and declines rapidly thereafter [205]. Levels of PPO activity are higher in resistant than in susceptible varieties and increase following inoculation with *F. graminearum* [205].

One possible strategy for reducing the risk of mycotoxin contaminations is the development of more resistant transgenic crops. Three approaches are possible [206]: (i) transgene-mediated control of the ability of *Fusarium* to infect and colonise the ear, through the overproduction of specific antifungal proteins and metabolites, or by increasing the plant's own defence systems in kernel tissues; (ii)

the prevention of mycotoxin biosynthesis, or the detoxification of mycotoxins in plants; and (iii) the development of more resistant plants based on transgenic crops engineered to produce a *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin. Some Bt maize hybrids have the potential to reduce the level of fumonisin B produced by *Fusarium verticillioides* [206]. This effect probably results from a decrease in sensitivity to one of the possible means of ear tissue contamination: attack by insects [206,207]. Indeed, *B. thuringiensis* is known to produce proteins toxic to insects [208]. This strategy has not yet been applied to wheat.

Type I resistance is generally estimated by determining the percentage of spikelets infected 7–21 days after inoculation or at maturity [9]. However, the number of infected spikelets does not necessarily reflect the total damage caused by the pathogen. The symptoms also depend on the severity and rapidity of rachis invasion by the pathogen.

**5.2.3.2. Type II: resistance to (kinetic) propagation of the pathogenic agent in the tissues [50].** The mechanisms involved in this type of resistance are purely active, such as inhibition of the translocation of deoxynivalenol [18] by an ABC (ATP-binding cassette) transporter protein, the Pdr5p (pleiotropic drug resistance) [209] or increasing the stability of cell membranes [18]. This process limits the propagation of *F. culmorum* and *F. graminearum* [95] from the glumes [18,26] and/or ovaries and glumes to the rachis and the pedicel [94–96]. The endo- or exocellular migration [94–96] of the fungus leads to a series of changes in host cells, including degeneration of the cytoplasm, organelles (e.g. chloroplasts) and cell wall [95,96] by enzymes such as cellulases, xylanases and pectinases [95,96] produced during the penetration and colonisation of the tissues of the wheat ear [95,96]. Once attacked, susceptible varieties respond to infection only by forming a very thin wall in the periplasmic space of the infected tissues [94]. In contrast, resistant varieties react strongly: extensive formation of a very thick wall located close to the infected cells and of a large papilla formed by the rapid and intense deposition of callose ( -1,3-glucan), lignin and other compounds [94]. Three days after inoculation, defence structures are more solid, with denser cell walls, particularly in cells adjoining contaminated cells, in the envelopes of cultivar Frontana (resistant) than in those of cultivar Agent (susceptible) [210]. The process of lignification may be involved in plant defences, establishing mechanical barriers to pathogen invasion [94,210], modifying the structure of cell walls and making them more resistant to the degradative enzymes produced by the pathogen [210]. Furthermore, lignification may inhibit or reduce the diffusion of small molecules or ions, including the mycotoxins secreted by the fungal hyphae in the host cells [94,210], and reduce the movement of nutrients from the host cell to the pathogen [210]. In addition to the lower permeability of the cell membranes in resistant genotypes, the basis of the inhibition of deoxynivalenol translocation may also involve a lower affinity of the

membrane for deoxynivalenol [26]. This hypothesis is based largely on observations in two types of mutant yeast [144]. One of these types of mutant yeast presents a low affinity and low cell membrane permeability for trichothecenes, and in the other, the 60S ribosomal subunit has a lower than normal affinity for these toxins. The target of deoxynivalenol is a cytoplasmic peptidyl transferase [211]. Mammalian and fungal cells have a modified peptidyl transferase that is tolerant to trichothecenes [211]. In cases of type II resistance, the trichothecenes seem to bind to the ribosomal 60S subunit, by methylation, thereby blocking the translation of the RNA and inhibiting protein synthesis [38,43,145]. This inhibition leads to the inhibition of peptidyl transferase activity, opposing resistance to trichothecenes. In cases in which the membrane is not permeable to deoxynivalenol, a virulence factor promoting fungal growth [26] the propagation of the pathogen agent is restricted. Thus, 3–5 days after inoculation, susceptible varieties display more extensive propagation of the fungus, higher levels of deoxynivalenol accumulation and fewer pathological changes in infected tissues [94]. A hypersensitive reaction is also possible [18]. This type of resistance can be identified visually by observing the symptoms, which reflect the propagation of the disease from the point of infection [9]. It is also characterised by low levels of ergosterol (an indicator of fungal biomass) [3]. The most well known variety displaying this type of resistance is Sumai 3 [189].

Type I and II resistances may be combined in a given genotype [18,50]. This results in a variety tolerating the invasion of grains that displays no symptoms on the grains [50]. Similarly, the number of infected spikelets does not necessarily reflect the total amount of damage done by the pathogen. The amount of damage also depends on the severity and rapidity of the invasion of the rachis by the fungus. Thus, the three principal sources of variation in the expression of symptoms are the environment [57], the species and/or strain of *Fusarium* [57,212] and factors involved in the maturation of cereals that also play an important role in the epidemiological profile of the disease [212]. Wheat contamination is favoured by high levels of precipitation in the 10 days preceding grain maturity, but only if the minimum temperature in the 10 days following ear emergence is sufficiently high [212]. It should be noted that these factors are varietal and also depend on the fungal species concerned [212].

It seems likely that, in certain cases, the production of trichothecenes (deoxynivalenol in particular) by fungi activates their development (hyphal growth: type II resistance) and colonisation (type I resistance), by interfering with the defence response of the plants [18,26,175,213]. The quantity of trichothecenes in the grains is controlled by the degradation of deoxynivalenol and by the tolerance of the plants to this toxin [18].

Two other types of resistance have recently been discovered. Both involve defence reactions directed against trichothecenes, in which the synthesis of this toxin is blocked or its degradation enhanced [147,214].

5.2.3.3. *Type III: resistance involving the capacity to degrade deoxynivalenol* [214–216]. In some varieties (e.g. Fredrick), enzymatic systems for the detoxification (degradation) of trichothecenes, involving the acetyltransferase Ayt1p [209], for example, have been identified based on a decrease in the amount of deoxynivalenol 6 weeks after inoculation [215]. Deoxynivalenol begins to accumulate 3 days after inoculation (4 days according to Savard et al. [149]) of an ear. The concentration of this toxin increases, peaking after 6 weeks, and then decreases naturally to a concentration that remains constant thereafter at maturity, harvest and during grain storage [90].

This resistance was identified by inoculating grains of wheat, rice and triticale with a single strain of *F. graminearum* [214]. This study showed that the varieties most resistant to pathogen development (low *F. graminearum* biomass, as estimated from ergosterol content) have a higher ergosterol/deoxynivalenol ratio than do varieties more susceptible to the development of this pathogen. This implies that the susceptible varieties are able to degrade the deoxynivalenol produced by the large number of fungi present.

This type III resistance, characterised by a high ergosterol/deoxynivalenol ratio [213], protects against symptoms due to the propagation of the fungus. However, there may nonetheless be a decrease in the number or weight of grains and their size [9]. This resistance is estimated visually by measuring yield and by comparing the values obtained for ears with and without symptoms [9] but this estimation also depends on resistance to grain infection.

5.2.3.4. *Type IV: resistance involving tolerance to high concentrations of deoxynivalenol (apparent insensitivity to trichothecenes)* [3]. Like cultivars with type II resistance linked to the modification of peptidyl transferase, the target of deoxynivalenol, cultivars with type IV resistance also have a modified peptidyl transferase [3]. This enzyme stabilises the membrane, conferring greater tolerance to trichothecenes [43]. It has also been suggested that changes in the permeability of the cell wall or in the signal transduction cascade in the cell inducing greater tolerance to trichothecenes by thaumatin-like proteins can account for this type of resistance [198].

For a given severity of disease, this resistance is generally estimated by a higher level of deoxynivalenol compared to other genotypes [9].

5.2.3.5. *Type V: resistance to grain infection* [5]. This type of resistance results in differences in yield despite similar levels of attack or, conversely, little effect on yield despite the evident presence of the disease after artificial inoculation [5,9,217]. In contrast to the other types of resistance, this type of resistance may not correspond to a physiological process, but rather to the “morphological” expression of an interaction between various complex processes: resistance of types II–IV.

### 5.3. Resistance to head blight according to the composition of plant tissues

In addition to genetic resistance, the composition of plant tissues is also a criterion of resistance to the development and/or propagation of the fungus and its toxins. The susceptibility of wheat cultivars is linked to the concentration of choline in the ear at anthesis [218], superoxide dismutase activity in the ears in cases of contamination by deoxynivalenol or *F. graminearum* [219] and the concentration of *p*-coumaric acid, one of the phenolic acid precursors of lignin [210]. The quantity of this compound in the ear is much higher after inoculation of the glumes, envelopes and rachis with *F. culmorum* than in uninoculated tissues [210]: this is thus a very important factor determining the susceptibility of crops. The accumulation of an acetyltransferase encoded by *FsTri101* in the endosperm and glumes of wheat confers partial protection against *F. graminearum* [220]. Similarly, feluric acid in the ears seems to be involved in resistance to ear blight in maize [221], although healthy and inoculated ears contain similar amounts of this compound [210].

The composition of wheat and barley grains may also affect contamination levels [134]. Couture [134] suggested that a high gluten content in hard wheats and a high starch/protein ratio in malting barley could protect the crop against head blight.

The relative sugar content of leaves or stems has been proposed as an indicator of susceptibility to diseases [222]. Unlike powdery mildew, head blight is favoured by a low sugar content of the tissues [222]. Similar results were obtained in studies of stem blight in maize, involving a parasitic complex consisting of 70% *F. graminearum* [129]. The refraction index of the sap of a section of pressed stem is used to assess the sugar content of stem bases (Bertrand’s method) and it has been shown that the higher the sugar content of maize stems, the more resistant to stem blight the maize is likely to be [129]. Messiaen [129] also indicated that *F. graminearum* is equally able to use sugars, starch and cellulose as sources of carbon, and proteins, ammonium salts or nitrates as sources of nitrogen. Thus, *Fusarium* makes use of storage proteins, and degrades the cell walls and starch grains of infected grains [41,42].

## 6. Conclusion

Head blight is a widespread disease with major consequences for health. However, it has been little studied in the open field. Indeed, field studies of the epidemiological cycle of the disease are hindered by a major problem: identification of the species and strains making up the parasitic complex of the inoculum. A mean of five to seven species, and up to nine in total [8], may be present in the same field in the same year. These species can only be identified after culture in Petri dishes and the observation of a collection

of morphological criteria (colour, macroconidia, microconidia, ascospores, chlamydoconidia of a strain), which requires the conservation of living spores, or molecular genotyping (which remains difficult for these species).

In the laboratory, the various steps in the plant infection process and in mycotoxin production are essentially studied from an environmental viewpoint. Uncertainties remain concerning, in particular, the necessity of inducing the development of perithecia by exposure to ultraviolet light, the natural climatic conditions in which spores are released (macroconidia and ascospores) and the sensitivity of these mechanisms to environmental factors.

In the field, spore dispersal depends on climatic factors in two ways: climatic factors affect spore production (see Section 2.2) and strongly regulate spore release. However, the climatic conditions required for spore release are unclear. This is probably due to the difficulties involved in identifying and isolating the various types of spore (ascospores or macroconidia). Furthermore, the results obtained probably depend on the maturity of the spores: four periods of release over a period of 20–30 days have been observed.

However, it seems that macroconidia are dispersed by means of splashing during rainfall. In contrast, the release of ascospores is only triggered by rainfall (or high humidity), resulting in the rehydration of the perithecia after a dry period. The true release of the ascospores occurs several days later, depending on air humidity. Ascospore release, in *F. graminearum* in particular, appears to be periodic.

Although the dispersal pathways of the spores are known (splashing for the macroconidia and/or ascospores and wind dispersal for ascospores only) and long-distance dispersal appears to be possible, the maximum dispersal distance and the contaminating potential of splashing and wind dispersal have yet to be determined. Furthermore, local contamination seems to predominate in the epidemiological profile of the disease in that two neighbouring plots planted with the same variety may present very different levels of contamination.

The importance of local contamination raises the question of the hypothetical contamination of spikelets via the systemic route. This question remains unanswered because as far as we know no study has shown, microscopically, the systemic colonisation of the spikelets and the growth of the fungus in plant tissues (or the impossibility of such colonisation). Similarly, the existence, conditions of existence and potential importance of such contamination have not been precisely determined. Conflicting results have been obtained and it is possible that this route of contamination is possible only for a few plant genotypes, for a few fungal species or strains, or for a few plant–fungus interactions. Indeed, interactions between plants and pathogens have been observed during infection. We can therefore presume that the virulence characteristics of the infecting fungal strain, the resistance of the plant and the virulence–avirulence interaction between plants and pathogens determines the capacity of the plant to be infected by mycelium and/or spores, the speed of infection (colonisation) of the ear by the fun-

gal mycelium and the amount of mycotoxins present in the grains at harvest. These phenomena, like the production of inoculum, also depend on climate.

The choice of variety is a practical consideration that may affect plant infection: the date and site of fungal penetration, the propagation rate and the intensity of the consequences of the attack (severity of symptoms and/or amount of toxins). Indeed, the choice of variety determines the major mechanisms of varietal resistance activated. However, it should be stressed that although various types of resistance have been identified, they have not yet been entirely elucidated. Furthermore, the types of varietal resistance have not yet been characterised for most wheat varieties, which makes it difficult to compare varieties in a particular area. Together with genetic characteristics, sowing date and climate determine the date at which the crop is most susceptible to infection. The extent of infection depends directly on the quality of inoculum, the primary source of which is crop residues. In the epidemiological cycle of the disease, residues probably modify the conservation and development of the fungus and spore dispersal, with effects depending on the amount of residue present (which depends on soil tillage methods and the preceding crop) and their nutritive value for the pathogen and for the plant (which also depends essentially on the preceding crop). The high levels of nitrogen in maize residues may result in a longer period of residue colonisation by *Fusarium*, strengthening pathogen populations, and stimulating their development. If too many crop residues are present, spore dispersal by splashing may be physically limited by obstacles. Conversely, if the fungus has access to too few residues or residues insufficiently rich for it to complete its life cycle and to develop, then the fungus is likely to produce fewer spores and to disperse less effectively. There is also an interaction between these factors. Limited soil tillage methods increase the density of residues on the surface of the soil and hence increase the quantity of inoculum available, particularly if the preceding crop is a potential host of the fungus (e.g. maize or durum wheat). Mycelium development and the production and dispersal of spores therefore depend on climate and irrigation.

Although there is broad agreement among scientists and advisers concerning the effects of soil tillage, irrigation and preceding crop on both disease severity and contamination by mycotoxins, the cause of these effects remains unclear. In addition, uncertainties remain concerning the survival of the fungus and its capacity to sporulate in soil, according to soil aeration, porosity and light penetration, all of which are affected by soil tillage. Similarly, the role of the compounds generated by the degradation of crop residues and the rate of residue degradation—which depend on soil tillage, the nutritive value of the preceding crop and the microclimate of the residues, which itself depends on irrigation and its relationship to mineral composition (nitrogen, silicon, depending on the preceding crop)—make it difficult to predict the quantitative effects of soil tillage, preceding crop and irrigation.

Other unanswered questions remain concerning the effect of residue degradation on competition between microorganisms and/or plant resistance (notably by means of differences in mineral nutrition).

The effect of mineral nutrition on disease severity and mycotoxin contamination, if indeed there is one, remains unclear. The mineral balance of the soil influences pathogen populations and should therefore have repercussions for the development of *Fusarium*. The composition of plants, in terms of nitrogen and silicon, for example, probably affects the growth and development of the fungus, although this has not been explicitly demonstrated in wheat for several reasons: equilibrium between the various elements, fertilisation date, link with *Fusarium* foot rot, etc. A canopy with unlimited mineral nutrition develops well. This development slightly modifies the environmental conditions of the residues, which may in turn modify the rate of residue degradation. If this is indeed the case, then the capacity of the fungus to sporulate and of the spores to disperse may be affected.

The role played by canopy density, in terms of crop plant and weed densities, and in the development of epidemics of the disease remains to be determined. Weeds may carry *Fusarium*, but is their role limited to that of an intermediate host (during splashing) or do they act as a source of inoculum? If they serve as a source of inoculum, how many spores are produced on weeds? Weeds probably also play an indirect role, modifying mineral nutrition and/or microclimate by increasing plant population density. The overall density of plants in the canopy also depends on sowing density and the tillering capacity of the variety. Thus, weeds may affect the number of spores produced, spore maturation and/or spore dispersal. The uncertainties that remain probably arise at least in part from variations in the role played by weeds according to the type or family of weeds concerned and competition with the crop: date of emergence, density, etc. (which also depends on climate). Although canopy density (crop plus weeds) seems likely to play a role, we cannot be sure of the nature or magnitude of this effect.

It also seems clear that competition between microorganisms on the leaves and ears is likely to have an effect, but this is difficult to study in the field and necessarily depends on the fungicides used and on canopy development.

Five types of varietal resistance have been identified to date. They affect the penetration of the fungus into the plant (type I), infection kinetics (type II), the expression of the infection (symptoms; type III), the consequences of infection (quantity of mycotoxins produced, yield; type IV) and grain infection (type V). This complexity of plant resistance complicates any study of several varieties. In such studies, caution is required when interpreting results analysing the relationships between cultural practices and symptoms, between symptoms and the quantities of mycotoxins produced and between cultural practices and the mycotoxins produced.

In conclusion, the relationship between disease symptoms and mycotoxin contamination is of key importance. The con-

ditions in which this relationship is purely qualitative and those in which it also has a quantitative element are unclear. If we are to propose effective methods for the prevention of grain contamination by toxins, we must improve our understanding of this relationship, especially as concerns the role of the cropping system. Investigation of the effects of crop management and crop rotation on the profile of *Fusarium* species and strains obtained within a cereal field, and the conditions in which the potential for toxin production is expressed in agricultural environments, should be a research priority.

## Acknowledgements

We thank Alex Edelman and associates for their help in translating this paper from French into English. We also thank Alain Bone for tracking down the references and Stéphanie Pineau for help with the preparation of the manuscript.

## References

- [1] D. Atanasoff, *Fusarium* blight (scab) of wheat and other cereals, *J. Agric. Res.* 20 (1) (1920) 1–32.
- [2] J.C. Sutton, Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*, *Can. J. Plant Pathol.* 4 (1982) 195–209.
- [3] Y.Z. Wang, J.D. Miller, Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance, *J. Phytopathol.* 122 (1988) 118–125.
- [4] J.D. Miller, R. Greenhalgh, Y. Wang, M. Lu, Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species, *Mycologia* 83 (1991) 121–130.
- [5] A. Mesterhazy, Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat, *Plant Breeding* 114 (1995) 377–386.
- [6] D.W. Parry, P. Jenkinson, L. McLeod, *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review, *Plant Pathol.* 44 (1995) 207–238.
- [7] M. McMullen, R. Jones, D. Gallenberg, Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact, *Plant Dis.* 81 (1997) 1340–1348.
- [8] A. Bottalico, *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe, *J. Plant Pathol.* 80 (2) (1998) 85–103.
- [9] J.C. Rudd, R.D. Horsley, A.L. McKendry, E.M. Elias, Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems, *Crop Sci.* 41 (3) (2001) 620–627.
- [10] A. Bottalico, G. Perrone, Toxicogenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 611–624.
- [11] F.T. Bennett, *Fusarium* species on British cereals, *Ann. Appl. Biol.* 20 (2) (1933) 272–290.
- [12] G.W. Pugh, H. Johann, J.G. Dickson, Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*, *J. Agric. Res.* 46 (1933) 771–797.
- [13] P. Ruckebauer, H. Buerstmayr, M. Lemmens, Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.), *Euphytica* 119 (2001) 121–127.
- [14] R. Cassini, Facteurs favorables ou défavorables au développement des fusarioses et septorioses du blé, in: *Proceedings of the Meet-*

- ing of Sections Cereals and Physiology, Eucarpia, Dijon, 1970, pp. 271–279.
- [15] R.A. Daamen, C.J. Langerak, W. Stol, Surveys of cereal diseases and pests in The Netherlands. III. *Monographella nivalis* and *Fusarium* spp. in winter wheat fields and seed lots, *Neth. J. Plant Pathol.* 97 (1991) 105–114.
- [16] D. Caron, Les Fusarioses, in: *Maladies des blés et orges*, ITCF, 1993, pp. 30–39.
- [17] P. Jenkinson, D.W. Parry, Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*, *Mycol. Res.* 98 (1994) 506–510.
- [18] T. Ban, Studies on the genetics of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in wheat, in: J. Raupp, Z. Ma, P. Chen, D. Liu (Eds.), *Proceedings of the International Symposium on Wheat Improvement for Scab Resistance. Section II. Genetic Analysis and Gene Mapping for Scab Resistance*, China, 2000, pp. 5–10.
- [19] R. Dill-Macky, R.K. Jones, The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat, *Plant Dis.* 84 (2000) 71–76.
- [20] R. Ioos, B. Bakan, Study of the *Fusarium* spp. from cereal grains and their related mycotoxins, in: *AFPP—6ème conférence internationale sur les maladies des plantes*, vol. 1, Tours, France, 2000, pp. 427–434.
- [21] C. Maumené, M. Leuillet, D. Caron, F. Henriot, Incidence des fongicides et de la variété sur le risque de contamination du blé tendre par le déoxynivalénol (DON) en France: premiers résultats, in: *AFPP—6ème conférence internationale sur les maladies des plantes*, vol. 1, Tours, France, 2000, pp. 459–466.
- [22] D.R. Simpson, G.E. Weston, J.A. Turner, P. Jennings, P. Nicholson, Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain, *Eur. J. Plant Pathol.* 107 (2001) 421–431.
- [23] R.J. Cook, A.A. Christen, Growth of cereal root-rot fungi as affected by temperature–water potential interactions, *Phytopathology* 66 (1976) 193–197.
- [24] R.W. Stack, M.P. McMullen, Head blighting potential of *Fusarium* species associated with spring wheat heads, *Can. J. Plant Pathol.* 7 (1985) 79–82.
- [25] C.H.A. Snijders, Diallel analysis of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat, *Euphytica* 50 (1990) 1–9.
- [26] C.H.A. Snijders, C.F. Krechting, Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat, *Can. J. Bot.* 70 (1992) 1570–1576.
- [27] S. Homdork, H. Fehrmann, R. Beck, Effects of field application of tebuconazole on yield, yield components and the mycotoxin content of *Fusarium*-infected wheat grain, *J. Phytopathol.* 148 (2000) 1–6.
- [28] L.N. Jorgensen, Control of *Fusarium* ear blight in winter wheat, in: *Proceedings of the 17th Danish Plant Protection Conference, Site-Specific Crop Protection, Decision Support, Pests and Diseases, Ear Blight*, Denmark, 2000 (Abstract, in Danish).
- [29] W.G. Smith, *Diseases of Field and Garden Crops*. Cité par Parry, 1995, Macmillan, London, 1884, pp. 208–213.
- [30] A. Mesterhazy, A.K. Rowaished, Analysis of symptoms caused by *Fusarium graminearum* Schwabe and its relation to powdery mildew infection in wheat, *Acta Phytopathol. Acad. Scientiarum Hung.* 12 (3–4) (1977) 289–301.
- [31] B. Carlier, Les fusarioses: des maladies dures à combattre, *Jeunes Agriculteurs* 557 (2001).
- [32] W. Ahrens, H. Fehrmann, Attack of wheat by *Septoria nodorum* and *Fusarium* ear scab. I. Crop loss analysis, *J. Plant Dis. Prot.* 91 (1) (1984) 42–58.
- [33] V. Le Boulc'h, S. Bedouret, V. Poyet, T. Barchietto, D. Hazouard, I. De Paepe, J.M. Seng, Un test innovant pour contrôler la qualité sanitaire des céréales: détection des champignons potentiellement producteurs d'une famille de mycotoxines, les trichothécènes, in: *AFPP—6ème conférence internationale sur les maladies des plantes*, vol. 1, Tours, France, 2000, pp. 451–458.
- [34] P. Galtier, C. Comera, I. Oswald, O. Puel, Mycotoxines: origines et toxicités, in: *AFPP—6ème conférence internationale sur les maladies des plantes*, vol. 1, Tours, France, 2000, pp. 77–86.
- [35] J. Gilbert, A. Tekauz, Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada, *Can. J. Plant Pathol.* 22 (2000) 1–8 (Review).
- [36] J. Chelkowski, Fungal pathogens influencing cereal seed quality at harvest. Cité par Ruckebauer et al. (2001), in: J. Chelkowski (Ed.), *Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Developments in Food Science*, vol. 26, Elsevier, Amsterdam, 1991, pp. 53–56.
- [37] D. Thouvenot, Moisissure et mycotoxine, in: *Mycotoxines: un prochain enjeu de sécurité alimentaire?*, CERAAF, 2002, pp. 14–17.
- [38] B. Bakan, Approche physiologique de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*, Thèse INA-PG, 1998, 150 pp.
- [39] D.R. Vidal, Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothécènes, *Bull. Inst. Pasteur* 88 (1990) 159–192.
- [40] J.F. Quillien, *Les mycotoxines*, Institut National de la Recherche Agronomique, France, 2002, 24 pp.
- [41] D.B. Bechtel, L.A. Kaleikau, R.L. Gaines, L.M. Seitz, The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels, *Cereal Chem.* 62 (3) (1985) 191–197.
- [42] L.M. Seitz, W.T. Yamazaki, R.L. Clements, H.E. Mohr, L. Andrews, Distribution of deoxynivalenol in soft wheat mill streams, *Cereal Chem.* 62 (6) (1985) 467–469.
- [43] F. Eudes, Etude de l'impact des trichothécènes de *Fusarium* chez le blé et sélection in vitro pour la résistance à la fusariose de l'épi, Université de Laval Québec, 1998, 83 pp. + annexes.
- [44] IARC, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, in: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 56, Lyon, 1993.
- [45] W. Langseth, R. Hoie, M. Gullord, The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination of Norwegian oats 1985–1990, *Acta Agric. Scand.* 45 (1995) 63–67.
- [46] L.J. Francl, Development of *Fusarium* head blight in relation to environment and inoculum, in: *National Fusarium Head Blight Forum. Chapter 1. Epidemiology and Disease Management*, Michigan State University, USA, 1998, pp. 1–3.
- [47] A.L. Andersen, The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat, *Phytopathology* 38 (1948) 595–611.
- [48] R. Cassini, A propos des dégâts provoqués par *Fusarium roseum* dans les cultures de céréales du bassin parisien, *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 1967, pp. 858–867.
- [49] G.H. Bai, R. Plattner, A.E. Desjardins, F. Kolb, Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat, *Plant Breeding* 120 (2001) 1–6.
- [50] H.W. Schroeder, J.J. Christensen, Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*, *Phytopathology* 53 (1963) 831–838.
- [51] J. Chelkowski, H. Wisniewska, T. Adamski, P. Golinski, Z. Kaczmarek, M. Kostecki, J. Perkowski, M. Surma, Effects of *Fusarium culmorum* head blight on mycotoxin accumulation and yield traits in barley doubled haploids, *J. Phytopathol.* 148 (2000) 541–545.
- [52] B.J. Blaney, R.L. Dodman, Production of zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, and acetylated derivatives by Australian isolates of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* in relation to source and culturing conditions, *Aust. J. Agric. Res.* 53 (2002) 1317–1326.
- [53] N. Magan, R. Hope, A. Collette, E.S. Baxter, Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 685–690.
- [54] D.C. Hooker, A.W. Schaafsma, L. Tamburic-Illincic, Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat, *Plant Dis.* 86 (2002) 611–619.

- [55] A. Champeil, J.F. Fourbet, T. Doré, Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat, *Crop Prot.*, in press.
- [56] L. Scott, S. Leath, W. Hagler, J. Murphy, Variation in *Fusarium graminearum* associated with wheat scab in North Carolina, in: National *Fusarium* Head Blight Forum. Chapter 1. Epidemiology and Disease Management, Michigan State University, USA, 1998, 15 pp.
- [57] M. Dusabenyagasani, R.C. Hamelin, J. Collin, D. Dostaler, Importance de l'interaction entre les cultivars de blé et les souches de *Fusarium graminearum* dans l'évaluation de la résistance à la fusariose de l'épi, *Phytoprotection* 78 (2) (1997) 53–60.
- [58] P. Pissinger, *Fusarium* infection of wheat seeds in the Vas province, Novenyvedelem 18 (1982) 83–85 (Abstract, in Hungarian).
- [59] D. Caron, Fusarioses des épis. Sait-on prévoir leur développement? *Perspect. Agricoles* 253 (2000) 56–62.
- [60] M.G. Cromey, S.C. Shorter, D.R. Lauren, K.I. Sinclair, Cultivar and crop management influences on *Fusarium* head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand, *N. Z. J. Crop Horticultural Sci.* 30 (2002) 235–247.
- [61] G. Bai, G. Shaner, Scab of wheat: prospects for control, *Plant Dis.* 78 (8) (1994) 760–766.
- [62] P. Jenkinson, D.W. Parry, Isolation of *Fusarium* species from common broad-leaved weeds and their pathogenicity to winter wheat, *Mycol. Res.* 98 (1994) 776–780.
- [63] C.M. Messiaen, R. Cassini, Recherches sur les Fusarioses. IV. La systématique des *Fusarium*, *Ann. Epiphytes* 19 (3) (1968) 387–454.
- [64] F. Rapilly, J.M. Lemaire, R. Cassini, Les Fusarioses, in: Les maladies des céréales—Principales maladies cryptogamiques, INRA-ITCF, 1973, 119 pp.
- [65] G. Le Henaff, B. Oste, E. Wilhem, A. Faure, J. Moinard, P. Lepoutre, O. Pillon, Bilan sanitaire 2001–2002 des céréales. Retour au sec et au calme pour des résultats moyens, *Phytoma* 556 (2003) 22–26.
- [66] F. Trail, H. Xu, R. Loranger, D. Gadoury, Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*), *Mycologia* 94 (2002) 181–189.
- [67] T. Paulitz, Diurnal release of ascospores by *Gibberella zeae* in inoculated wheat plots, *Plant Dis.* 80 (1996) 674–678.
- [68] F. Trail, D. Gadoury, R. Loranger, Environmental parameters of ascospore discharge in *Gibberella zeae*, in: National *Fusarium* Head Blight Forum. Chapter 1. Epidemiology and Disease Management, Michigan State University, USA, 1998, pp. 11–13.
- [69] W.L. Gordon, The occurrence of *Fusarium* species in Canada. VI. Taxonomy and geographic distribution of *Fusarium* species on plants, insects, and fungi. Cité par Parry et al., 1995, *Can. J. Bot.* 37 (1959) 257–290.
- [70] J.A. Clement, D. Parry, Stem-base disease and fungal colonisation of winter wheat grown in compost inoculated with *Fusarium culmorum*, *F. Graminearum* and *Microdochium nivale*, *Eur. J. Plant Pathol.* 104 (1998) 323–330 (Abstract).
- [71] C.S. Millar, J. Colhoun, *Fusarium* diseases of cereals. IV. Observations on *Fusarium nivale* on wheat, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52 (1969) 57–66.
- [72] V.W.L. Jordan, E.C. Fielding, *Fusarium* spp. on wheat. Cité par Parry, 1995, Long Ashton Research Station, 1988.
- [73] C.H.A. Snijders, Systemic fungal growth of *Fusarium culmorum* in stems of winter wheat, *J. Phytopathol.* 129 (1990) 133–140.
- [74] T. Sieber, T.K. Risen, E. Müller, P.M. Fried, *Endophytic fungi* in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. Et germ. = *Septoria nodorum* (Berk.) Berk. Cité par Jenkinson, 1994b, *J. Phytopathol.* 122 (1988) 289–306.
- [75] W.G.D. Fernando, J.D. Miller, W.L. Seaman, K. Seifert, T.C. Paulitz, Daily and seasonal dynamics of airborne spores of *Fusarium graminearum* and other *Fusarium* species sampled over wheat plots, *Can. J. Bot.* 78 (2000) 497–505.
- [76] H.M. Hörberg, Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 73–80.
- [77] F.J. Bannon, B.M. Cooke, Studies on dispersal of *Septoria tritici* pycnidiospores in wheat–clover intercrops, *Plant Pathol.* 47 (1998) 49–56.
- [78] B. Birzele, A. Meier, H. Hindorf, J. Krämer, H.W. Dehne, Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 667–673.
- [79] R.W. Stack, Gradients of *Fusarium* head blight in wheat along transects away from a concentrated source of *Gibberella zeae* ascospore inoculum, in: Proceedings of the 1997 National *Fusarium* Head Blight Forum, St. Paul, Minn, 10–12 November 1997, 60 pp.
- [80] R. Bandyopadhyay, L.K. Mughogho, M.V. Satyanarayana, M.E. Kalisz, Occurrence of airborne spores of fungi causing grain mould over a sorghum crop, *Mycol. Res.* 95 (11) (1991) 1315–1320.
- [81] F.R. Sanderson, *Fusarium* diseases of cereals. VIII. Discharge and dispersal of ascospores of *Calonectria nivalis*, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55 (1) (1970) 137–140.
- [82] C.T. Ingold, *Fungal Spores: Their Liberation and Dispersal*. Cité par Paulitz, 1996, Clarendon Press, Oxford, UK, 1971.
- [83] A.T. Tschanz, R.K. Horst, P.E. Nelson, The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*, *Mycologia* 68 (1976) 327–340.
- [84] H.Z. Ye, On the biology of the perfect stage of *Fusarium graminearum* Schw. Cité par Sutton, 1982, *Acta Phytopathol. Sin.* 7 (1980) 35–42.
- [85] <http://www.syngenta.ca>, 2002.
- [86] R.N. Strange, H. Smith, A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*, *Physiol. Plant Pathol.* 1 (1971) 141–150.
- [87] J. Lacey, G.L. Bateman, C.J. Mirocha, Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat, *Ann. Appl. Biol.* 134 (1999) 277–283.
- [88] K. Matsui, M. Yoshida, T. Ban, T. Komatsuda, N. Kawada, Role of male-sterile cytoplasm in resistance to barley yellow mosaic virus and *Fusarium* head blight in barley, *Plant Breeding* 121 (2002) 237–240.
- [89] R.N. Strange, H. Smith, Effects of choline, betaine and wheat-germ extract on growth of cereal pathogens, *Trans. Br. Mycol. Soc.* 70 (2) (1978) 193–199.
- [90] A.H. Teich, Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* spp., in: J. Chelkowski (Ed.), *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam (NLD), 1989, Chapter 16, pp. 269–282.
- [91] B.D. McCallum, A. Tekauz, Influence of inoculation method and growth stage on *Fusarium* head blight in barley, *Can. J. Plant Pathol.* 24 (2002) 77–80.
- [92] L.M. Reid, T. Woldemariam, X. Zhu, D.W. Stewart, A.W. Schaafsma, Effect of inoculation time and point of entry on disease severity in *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, or *Fusarium* subglutinans inoculated maize ears, *Can. J. Plant Pathol.* 24 (2002) 162–167.
- [93] M. Urban, S. Daniels, E. Mott, K. Hammond-Kosack, Arabidopsis is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*, *Plant J.* 32 (2002) 961–973.
- [94] Z. Kang, H. Buchenauer, Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57 (2000) 255–268.
- [95] W.M. Wanjiru, K. Zhensheng, H. Buchenauer, Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 803–810.
- [96] Z. Kang, H. Buchenauer, Studies on the infection process of *Fusarium culmorum* in wheat spikes: degradation of host cell wall com-

- ponents and localization of trichothecene toxins in infected tissue, Eur. J. Plant Pathol. 108 (2002) 653–660.
- [97] J.M. Sung, R.J. Cook, Effects of water potential on reproduction and spore germination by *Fusarium roseum* 'graminearum', 'culmorum', and 'avenaceum', Phytopathology 71 (5) (1981) 499–504.
- [98] R. Cassini, Influences des techniques de culture sur le développement des maladies des céréales. Chap. Méthodes de lutte culturale, génétique et biologique, in: La lutte contre les maladies des céréales, ITCF, Versailles, 1973, pp. 17–34.
- [99] A.H. Teich, K. Nelson, Survey of *Fusarium* head blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983, Can. Plant Dis. Surv. 64 (1) (1984) 11–13.
- [100] A.H. Teich, J.R. Hamilton, Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium, and pH on the incidence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in wheat, Appl. Environ. Microbiol. 79 (6) (1985) 1429–1431.
- [101] H. Krebs, D. Dubois, C. Kulling, H.R. Forrer, The effects of preceding crop and tillage on the incidence of *Fusarium* spp. and mycotoxin deoxynivalenol content in winter wheat grain, Agrarforschung 7 (2000) 264–268 (Abstract, in German).
- [102] L. Manuca, Competition between predominant bacteria in the wheat rhizosphere and *Fusarium culmorum* (Sm.) Sacc. in vitro, ICCPT Fundulea 35 (1969) 765–774 (Abstract).
- [103] K. Trolldenier, Maladie des céréales et nutrition des plantes, Revue de la Potasse 23 (1969) 1–16.
- [104] I. Coulomb, J. Caneill, H. Manichon, Comportement du sol au labour: méthode d'analyse et évaluation des conséquences de l'état initial du sol sur l'état transformé par le labour, Agronomie 13 (1993) 45–56.
- [105] J. Guerif, G. Richard, C. Durr, J.M. Machet, S. Recous, J. Roger-Estrade, A review of tillage effects on crop residue management, seedbed conditions and seedling establishment, Soil Tillage Res. 61 (2001) 13–32.
- [106] D.C. Reicosky, Tillage-induced soil properties and chamber mixing effects on gas exchange, in: Proceedings of the 16th Triennial Conference of the International Soil Tillage Research Organisation, vol. 1, Erica Maddock, Acacia Computing Services Pty Ltd., The University of Queensland, Brisbane, Australia, 2003, 117 pp.
- [107] Y. Ben-Yephet, M. Reuven, A. Genizi, Effects of inoculum depth and density on *Fusarium* wilt in carnations, Phytopathology 84 (12) (1994) 1393–1398.
- [108] G.L. Bateman, H. Coskun, Populations of *Fusarium* spp. in soil growing continuous winter wheat, and effects of long-term application of fertilizers and of straw incorporation, Mycol. Res. 99 (11) (1995) 1391–1394.
- [109] G.L. Bateman, G. Murray, R.J. Gutteridge, H. Coskun, Effects of method of straw disposal and depth of cultivation on populations of *Fusarium* spp. in soil and on brown foot rot in continuous winter wheat, Ann. Appl. Biol. 132 (1998) 35–47.
- [110] M. Jalaluddin, J.F. Jenkyn, Effects of wheat crop debris on the sporulation and survival of *Pseudocercospora herpotrichoides*, Plant Pathol. 45 (1996) 1052–1064.
- [111] D.J. Yarham, The effect on soil-borne diseases of changes in crop and soil management, in: B. Schippers, W. Gams (Eds.), Soil-Borne Plant Pathogens, Academic Press, London, 1979, pp. 371–383.
- [112] B.S. Rodgers-Gray, M.W. Shaw, Substantial reductions in winter wheat diseases caused by addition of straw but not manure to soil, Plant Pathol. 49 (2000) 590–599.
- [113] T.L.W. Carver, R.J. Zeyen, G.G. Ahlstrand, The relation between insoluble silicon and success or failure of attempted primary penetration by powdery mildew (*Erysiphe graminis*) germlings on barley, Physiol. Mol. Plant Pathol. 31 (1987) 133–148.
- [114] R.R. Bélanger, P.A. Bowen, D.L. Ehret, J.G. Menzies, Soluble silicon: its role in crop and disease management of greenhouse crops, Plant Dis. 79 (4) (1995) 329–336.
- [115] B.A. Summerell, L.W. Burgess, T.A. Klein, A.B. Pattison, Stubble management and the site of penetration of wheat by *Fusarium graminearum* group 1, Phytopathology 80 (1990) 877–879.
- [116] M.L. Deadman, B.M. Cooke, Wheat disease and cereal-clover bi-crops, Manage. Focus 2 (1997) 15–19.
- [117] M.H. Leitch, P.D. Jenkins, Influence of nitrogen on the development of *Septoria* epidemics in winter wheat, J. Agric. Sci. 124 (1995) 361–368.
- [118] R.A. Martin, J.A. MacLeod, C. Caldwell, Influences of production inputs on incidence of infection by *Fusarium* species on cereal seed, Plant Dis. 75 (8) (1991) 784–788.
- [119] M. Lemmens, K. Haim, H. Lew, P. Ruckebauer, The effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight development and deoxynivalenol contamination in wheat, J. Phytopathol. 152 (2004) 1–8.
- [120] M.T. Fauzi, T.C. Paulitz, The effect of plant growth regulators and nitrogen on *Fusarium* head blight of the spring wheat cultivar max, Plant Dis. 78 (1994) 289–292.
- [121] R.W. Smiley, R.J. Cook, *Fusarium* foot rot of wheat and peas as influenced by soil applications of anhydrous ammonia and ammonia-potassium azide solutions, Phytopathology 62 (1972) 86–91.
- [122] D.M. Huber, R.D. Watson, Nitrogen form and plant disease, Annu. Rev. Phytopathol. 12 (1974) 139–165.
- [123] G. Lazarovits, Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past, Can. J. Plant Pathol. 23 (2001) 1–7.
- [124] H.J.M. Löffler, E.B. Cohen, G.T. Oolbekkink, B. Schippers, Nitrite as a factor in the decline of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in soil supplemented with urea and ammonium chloride, Neth. J. Plant Pathol. 92 (1986) 153–162.
- [125] M. Ciotola, P. Neumann, Role of post harvest and spring application of urea and *Trichoderma reesei* QM9414 on the development of *Venturia inequalis*. Cité par Teich, 1989, in: Proceedings of the Mycological Society America and Canadian Phytopathological Society, 1987.
- [126] B.K. Vaidehi, Effect of foliar application of urea on the behaviour of *Helminthosporium hawaiiensis* in the rhizosphere of rice, Indian J. Mycol. Plant Pathol. 3 (1973) 81–85.
- [127] A.K. Rowaished, The influence of different forms of nitrogen on *Fusarium* root-rot disease of winter wheat seedlings, Phytopathology 100 (1981) 331–339.
- [128] P.E. Onuorah, Effect of mineral nutrition on the *Fusarium* brown foot-rot of wheat, Plant Soil 1 (1969) 99–104.
- [129] C.M. Messiaen, Richesse en sucre des tiges de maïs et verse parasitaire, Revue de Pathologie Végétale et d'Entomologie Agricole de France 36 (1957) 209–213.
- [130] E. Kurek, J. Jaroszk-Scisel, Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions, Biol. Control 26 (2003) 48–56.
- [131] C. Alabouvette, Y. Couteaudier, J. Louvet, Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XI. Etude comparative du comportement des *Fusarium* spp. dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires enrichis en glucose, Agronomie 5 (1) (1985) 63–68.
- [132] C. Alabouvette, Y. Couteaudier, J. Louvet, Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XII. Activité respiratoire dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires enrichis en glucose, Agronomie 5 (1985) 69–72.
- [133] J.C. Arthur, Wheat scab. Cité par Teich, 1989 et Parry et al., 1995, Indiana Agric. Exp. Station Bull. 36 (1891) 129–132.
- [134] L. Couture, Réceptivité de cultivars de céréales de printemps à la contamination des graines sur inflorescence par les *Fusarium* spp., Can. J. Plant Sci. 62 (1982) 29–34.
- [135] M.G. Anderson, Winter Wheat Disease Survey 1985. Cité par Parry et al. 1995, Research Station Kentville, Nova Scotia, 1986, pp. 53–55.

- [136] E.W. Hanson, E.R. Ausemus, E.C. Stakman, Varietal resistance of spring wheats to fusarial head blights. Cité par Teich and Hamilton, 1989, *Phytopathology* 40 (1950) 902–914.
- [137] I. Bujold, T.C. Paulitz, O. Carisse, Effect of *Microsphaeropsis* sp. on the production of perithecia and ascospores of *Gibberella zeae*, *Plant Dis.* 85 (9) (2001) 977–984.
- [138] H. Diamond, B.M. Cooke, Preliminary studies on biological control of the *Fusarium* ear blight complex of wheat, *Crop Prot.* 22 (2003) 99–107.
- [139] I. Bujold, O. Carisse, T.C. Paulitz, Effect of *Microsphaeropsis* sp. strain P130A on the field production of perithecia of *Gibberella zeae* on wheat residues, in: *Proceedings of the Canadian Workshop on Fusarium Head Blight, Manitoba, 1999*, pp. 112–113.
- [140] M. Davanlou, A.M. Madsen, C.H. Madsen, J. Hockenhull, Parasitism of macroconidia, chlamydoconidia and hyphae of *Fusarium culmorum* by mycoparasitic *Pythium* species, *Plant Pathol.* 48 (1999) 352–359.
- [141] J.C. Zadoks, T.T. Chang, C.F. Knokaz, A decimal code for the growth stages of cereals, *Weed Res.* 14 (1974) 415–421.
- [142] J. Liggitt, P. Jenkinson, D.W. Parry, The role of saprophytic microflora in the development of *Fusarium* ear blight of winter wheat caused by *Fusarium culmorum*, *Crop Prot.* 16 (7) (1997) 679–685.
- [143] A. Mesterhazy, T. Bartok, Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the grains, *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 49 (2) (1996) 181–198.
- [144] C.S. McLaughlin, M.H. Vaughan, L.M. Campbell, C.M. Wei, M.E. Stafford, B.S. Hansen, Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. Cité par Eudes et al., 2000, in: J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, M.A. Mehman (Eds.), *Mycotoxins in Human and Animal Health*, Park Forest South Pathotox, 1977, pp. 262–272.
- [145] F. Eudes, A. Comeau, S. Rioux, J. Collin, Phytotoxicité de huit mycotoxines associées à la fusariose de l'épi chez le blé, *Can. J. Plant Pathol.* 22 (2000) 286–292.
- [146] E. Young, Fusariose de l'épi sur blé tendre. Le précédent et le travail du sol sont déterminants, *Cultivar* 506 (2001) 38–41.
- [147] C.H.A. Snijders, J. Perkowski, Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels, *Phytopathology* 80 (1990) 566–570.
- [148] R.C. Sinha, M.E. Savard, Concentration of deoxynivalenol in single kernels and various tissues of wheat heads, *Can. J. Plant Pathol.* 19 (1997) 8–12.
- [149] M.E. Savard, R.C. Sinha, W.L. Seaman, G. Fedak, Sequential distribution of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat spikes after inoculation with *Fusarium graminearum*, *Can. J. Plant Pathol.* 22 (2000) 280–285.
- [150] W.C.A. Gelderblom, K. Jaskiewicz, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, R.M. Horak, R.M. Vlegaar, N.P.J. Kriek, Fumonisin: novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (7) (1988) 1806–1811.
- [151] J.C. Wolf, J.R. Lieberman, C.J. Mirocha, Inhibition of F-2 (*Zearalenone*) biosynthesis and perithecia production of *Fusarium roseum* 'Graminearum', *Phytopathology* 62 (1972) 937–939.
- [152] J.C. Wolf, C.J. Mirocha, Regulations of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'Graminearum') by F-2 (*Zearalenone*), *Can. J. Microbiol.* 19 (1973) 725–734.
- [153] J.C. Wolf, C.J. Mirocha, Control of sexual reproduction in *Gibberella zeae* (*Fusarium roseum* 'Graminearum'), *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (3) (1977) 546–550.
- [154] R. Ios, A. Faure, Fusariose des épis, mycotoxines et traitements fongicides, *Phytoma* 539 (2001) 56–63.
- [155] C.M. Placinta, J.P.F. D'Mello, A.M.C. Macdonald, A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, *Anim. Feed Sci. Technol.* 78 (1999) 21–37.
- [156] A.W. Schaafsma, L. Tamburic-Ilincic, J.D. Miller, The effect of agronomic practice on the accumulation of deoxynivalenol (DON) in winter wheat fields in Ontario, 1996–1997, in: *National Fusarium Head Blight Forum. Chapter 1. Epidemiology and Disease Management*, Michigan State University, USA, 1998, pp. 7–9.
- [157] E. Jenny, A. Hecker, P. Kessler, C. Kulling, H.R. Forrer, Cereal fusarioses: varietal resistance and toxin contents, *Agrarforschung* 7 (2000) 270–273 (Abstract, in German).
- [158] E. Young, Itinéraire cultural blé. Ce qui favorise les mycotoxines, *Cultivar* 539 (2002) 52.
- [159] C.J. Mirocha, H.K. Abbas, C.E. Windels, W. Xie, Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (5) (1989) 1315–1316.
- [160] J. Perkowski, A. Pavlova, A. Srobarova, J. Stachowiak, P. Golinski, Group B trichothecenes biosynthesis in wheat cultivars after heads inoculation with *Fusarium culmorum* isolates, *Biologia* 57 (2002) 765–771 (Abstract).
- [161] B. Bakan, C. Giraud-Deville, L. Pinson, D. Richard-Molard, E. Fournier, Y. Brygoo, Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 5472–5479.
- [162] Y.Z. Jin, T. Yoshizawa, Relationship between the incidence of mycotoxigenic *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) in crop fields and the occurrence of trichothecenes in wheat, *Mycotoxins* 40 (1994) 39–42 (Abstract, in Japanese).
- [163] H. Hestbjerg, S. Elmholt, K.F. Nielsen, G. Felding, The ecology of toxin producing fungi, in: *Proceedings of the 17th Danish Plant Protection Conference, Site-Specific Crop Protection, Decision Support, Pests and Diseases, Ear Blight, Denmark, 2000* (Abstract, in Danish).
- [164] H. Hestbjerg, G. Felding, S. Elmholt, *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content, *J. Phytopathol.* 150 (2002) 308–312.
- [165] P. Jennings, M. Coates, J.A. Turner, P. Nicholson, Distribution of deoxynivalenol/nivalenol producing isolates of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in England and Wales, *Aspects Appl. Biol.* 68 (2003) 43–48.
- [166] J.P. Carter, H.N. Rezanoor, D. Holden, A.E. Desjardins, R.D. Plattner, P. Nicholson, Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 573–583.
- [167] A. Mesterhazy, Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*, *Z. Pflanzenzüchtg Plant Breeding* 91 (1983) 295–311.
- [168] C. ShouXi, G. Kleijer, Effects of *Fusarium* metabolites on growth of callus and seedling in triticale, *Acta Prataculturae Sin.* 10 (2001) 78–85 (Abstract).
- [169] S. Marin, N. Magan, J. Serra, A.J. Ramos, R. Canela, V. Sanchis, Fumonisin B1 production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain, *J. Food Sci.* 64 (5) (1999) 921–924.
- [170] W.L. Casale, L.P. Hart, Inhibition of protein synthesis in maize by trichothecene mycotoxins, *Phytopathology* 76 (1986) 1144 (Abstract).
- [171] A.E. Desjardins, R.H. Proctor, G. Bai, S.P. McCormick, G. Shaner, G. Buechley, T.M. Hohn, Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests, *Mol. Plant Microbe Interact.* 9 (9) (1996) 775–781.
- [172] L.F. Chen, Y.L. Song, Y.G. Xu, Variation in the concentrations of deoxynivalenol in the spikes of winter wheat infected by *Fusarium graminearum* Schw, *Acta Phytopathol. Sin.* 26 (1996) 25–28 (Abstract, in Chinese).
- [173] A. Mesterhazy, Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 675–684.
- [174] R.H. Proctor, A.E. Desjardins, S.P. McCormick, R.D. Plattner, N.J. Alexander, D.W. Brown, Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 691–698.

- [175] F. Eudes, A. Comeau, S. Rioux, J. Collin, Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight (*Fusarium graminearum*) development in spring wheat (*Triticum aestivum*), *Can. J. Plant Pathol.* 23 (2001) 318–322.
- [176] A.H. Teich, L. Shugar, A. Smid, Soft white winter wheat cultivar field-resistance to scab and deoxynivalenol accumulation, *Cereal Res. Commun.* 15 (1987) 109–114.
- [177] C.H.A. Snijders, *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat: a review, *Neth. J. Plant Pathol.* 96 (1990) 187–198.
- [178] W. Liu, W. Langseth, H. Skinnis, O.N. Elen, L. Sundheim, Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*, *Eur. J. Plant Pathol.* 103 (1997) 589–595.
- [179] C. Lamper, J. Téren, T. Bartok, R. Komoroczy, A. Mesterhazy, F. Sagi, Predicting DON contamination in *Fusarium*-infected wheat grains via determination of the ergosterol content, *Cereal Res. Commun.* 28 (3) (2000) 337–344.
- [180] J. Grabarkiewicz-Szczesna, E. Foremska, M. Kostecki, P. Golinski, J. Chelkowski, Trichothecenes accumulation in kernels of corn inoculated with *Fusarium poae* (Peck) Wollenw., *Nahrung* 43 (1999) 330–332.
- [181] J.F. Fourbet, L. Malmauret, T. Doré, P. Verger, Impact du mode de conduite des cultures sur la qualité agronomique et toxicologique du blé. Application à l'agriculture biologique, Report no. 99-36, Convention MAP/INRA, 2001.
- [182] S.L. Walker, S. Leath, W.M. Hagler, J.P. Murphy, Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with *Fusarium* head blight in North Carolina, *Plant Dis.* 85 (4) (2001) 404–410.
- [183] B. Cahagnier, Les mycotoxines des céréales, in: *Mycotoxines: un prochain enjeu de sécurité alimentaire?*, CERAAF, 2002, pp. 18–24.
- [184] A. Devaux, La fusariose de l'épi du blé, *Agriculture (Montreal)* 44 (1988) 8–25.
- [185] C.H.A. Snijders, The inheritance of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat, *Euphytica* 50 (1990) 11–18.
- [186] Y.J. Yu, Monosomic analysis for scab resistance and yield components in wheat cultivar Soo-mo 3, *Cereal Res. Commun.* 10 (3–4) (1982) 185–189.
- [187] F.L. Kolb, G.H. Bai, G.J. Muehlbauer, J.A. Anderson, K.P. Smith, G. Fedak, Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: mapping and manipulation with molecular markers, *Crop Sci.* 41 (3) (2001) 611–619.
- [188] L. Gervais, F. Dedryver, J.Y. Morlais, V. Bodusseau, S. Negre, M. Bilous, C. Groos, M. Trotter, Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat, *Theor. Appl. Genet.* 106 (2003) 961–970.
- [189] Z.Z. Liu, Z.Y. Wang, Improved scab resistance in China: sources of resistance and problems. Cité par Ban, 2000 et Rudd, 2001, in: S. Da (Ed.), *Wheat for the Non-Traditional Warm Areas*, International Conference, CIMMYT Publication, Mexico, 1991, pp. 178–188.
- [190] C. Pritsch, C.P. Vance, W.R. Bushnell, D.A. Somers, T.M. Hohn, G.J. Muehlbauer, Systemic expression of defense response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58 (2001) 1–12.
- [191] C.A. Urrea, R.D. Horsley, B.J. Steffenson, P.B. Schwarz, Heritability of *Fusarium* head blight resistance and deoxynivalenol accumulation from barley accession CIho 4196, *Crop Sci.* 42 (2002) 1404–1408.
- [192] A. Mesterhazy, T. Bartok, C.G. Mirocha, R. Komoroczy, Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding, *Plant Breeding* 118 (1999) 97–110.
- [193] L.P. Hart, J.J. Pestka, M.T. Liu, Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*, *Phytopathology* 74 (1984) 1415–1418.
- [194] H. Buerstmayr, M. Lemmens, G. Patschka, H. Grausgruber, P. Ruckebauer, Head blight (*Fusarium* spp.) resistance of wheat cultivars registered in Australia. Cité par Ruckebauer, 2001, *Die Bodenkultur* 47 (1996) 183–190.
- [195] M. Nakagawa, Studies on ear-scab resistance of wheat plants. 2. Genetical factors affecting on the inheritance of ear-scab disease of wheat plants. Cité par Teich, 1989, *Jpn. J. Breeding* 5 (1955) 22.
- [196] S. Hakimi, J. Liang, Y. Wu, C. Rosenberger, S. Castro, D. Shah, Gene therapy for plants. Cité par Ban, 2000, *Cereal Res. Commun.* 25 (1997) 745–747.
- [197] C. Pritsch, W.R. Bushnell, D.A. Somers, G.J. Muehlbauer, C.P. Vance, *Fusarium graminearum* infection on wheat spikes: early events, in: *National Fusarium Head Blight Forum. Chapter 1. Epidemiology and Disease Management*, Michigan State University, USA, 1998, 5 pp.
- [198] W.P. Chen, P.D. Chen, D.J. Liu, R. Kynast, B. Friebe, R. Velazhahan, S. Muthukrishnan, B.S. Gill, Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene, *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 755–760.
- [199] L.S. Dahleen, P.A. Okubara, A.E. Blechl, Transgenic approaches to combat *Fusarium* head blight in wheat and barley, *Crop Sci.* 41 (2001) 628–637.
- [200] T. Taira, T. Ohnuma, T. Yamagami, Y. Aso, M. Ishiguro, Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2002) 970–977.
- [201] G. Rebmann, F. Mauch, R. Dudler, Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein. Cité par Dahleen, 2001, *Plant Mol. Biol.* 17 (1991) 283–285.
- [202] A.I. Pekkarinen, B.L. Jones, Trypsin-like proteinase produced by *Fusarium culmorum* grown on grain proteins, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3849–3855.
- [203] A.I. Pekkarinen, T.H. Sarlin, A.T. Laitila, A.I. Haikara, B.L. Jones, *Fusarium* species synthesize alkaline proteinases in infested barley, *J. Cereal Sci.* 37 (2003) 349–356.
- [204] A.I. Pekkarinen, B.L. Jones, Purification and identification of barley (*Hordeum vulgare* L.) proteins that inhibit the alkaline serine proteinases of *Fusarium culmorum*, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1710–1717 (Abstract).
- [205] M. Mohammadi, H. Kazemi, Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance, *Plant Sci.* 162 (2002) 491–498.
- [206] J. Duvick, Prospects for reducing fumonisin contamination of maize through genetic modification, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 337–342 (Abstract).
- [207] R.A.d. Maagd, D. Bosch, W. Stiekema, *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants, *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 9–13.
- [208] C.H. Zhong, D.J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S.S. Lin, E.R. Hart, Characterization of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders, *J. Invertebrate Pathol.* 76 (2000) 131–139 (Abstract).
- [209] R. Mitterbauer, G. Adam, *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: useful model systems for the identification of molecular mechanisms involved in resistance of plants to toxins, *Eur. J. Plant Pathol.* 108 (2002) 699–703.
- [210] E. Siranidou, Z. Kang, H. Buchenauer, Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defence responses in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight, *J. Phytopathol.* 150 (2001) 200–208.
- [211] Anonyme, Protection Against Trichothecene Mycotoxins. Cité par Wang and Miller, 1988 et Eudes, 1998, National Academy Press, Washington, DC, 1983, 227 pp.

- [212] Y. Castonguay, L. Couture, Epidémiologie de la contamination des grains de céréales par les *Fusarium* spp., Can. J. Plant Pathol. 5 (1983) 222–228.
- [213] J.D. Miller, J.C. Young, H.L. Trenholm, *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins, Can. J. Bot. 61 (1983) 3080–3087.
- [214] J.D. Miller, J.C. Young, D.R. Sampson, Deoxynivalenol and *Fusarium* head blight resistance in spring cereals, J. Phytopathol. 113 (1985) 359–367.
- [215] J.D. Miller, J.C. Young, Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat, Can. J. Plant Pathol. 7 (1985) 132–134.
- [216] J.D. Miller, P.G. Arnison, Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana, Can. J. Plant Pathol. 8 (1986) 147–150.
- [217] R.W. Stack, Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains, Plant Health Prog. (2000).
- [218] X.Y. Li, Z.S. Wu, Studies on the relationship between choline concentration in flowering spikes and resistance to scab among bread wheat varieties. Cité par Eudes, 1998, Acta Agric. Sin. 20 (1994) 176–185.
- [219] Y.P. Wang, Y.Q. Liu, L. Shi, N.S. Pan, Z.L. Chen, SOD activity of wheat varieties with different resistance to scab, Acta Phytophysiol. Sin. 19 (4) (1993) 353–358 (Abstract).
- [220] P.A. Okubara, A.E. Blechl, S.P. McCormick, N.J. Alexander, R. Dill-Macky, T.M. Hohn, Engineering deoxynivalenol metabolism in wheat through the expression of a fungal trichothecene acetyltransferase gene, Theor. Appl. Genet. 106 (2002) 74–83.
- [221] R.W. Stack, J.D. Rasmussen, Ferulic acid as a factor in resistance in wheat to *Fusarium* head blight, Phytopathology 85 (1995) 1046.
- [222] J.G. Horsfall, A.E. Dimond, Interactions of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility, Z. Pflanzenkrankheiten 64 (7–10) (1957) 415–421.
- [223] T. Aoki, K. O'Donnell, Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the group 1 population of *Fusarium graminearum*, Mycologia 91 (4) (1999) 597–609.
- [224] T. Aoki, K. O'Donnell, Morphological characterization of *Gibberella coronicola* sp. nov., obtained through mating experiments of *Fusarium pseudograminearum*, Mycoscience 40 (1999) 443–453.
- [225] A.H. Wearing, L.W. Burgess, Water potential and the saprophytic growth of *Fusarium roseum* “graminearum”, Soil Biol. Biochem. 11 (1979) 661–667.



## 2- Eléments de bibliographie structurant la problématique

Nous venons de voir dans cette revue bibliographique que beaucoup d'aspects de l'épidémiologie de la fusariose sont assez mal connus : par exemple la quantité de résidus culturaux et les conditions climatiques permettant, en parcelle agricole, la survie et le développement des différentes espèces de champignons ; le mode de contamination des cultures par ces champignons ; les déterminants de la propagation des champignons (comme la résistance des parois cellulaires) ; le rôle des toxines dans les compétitions entre microorganismes, mais aussi dans l'infection et/ou la propagation du champignon.

Néanmoins, depuis vingt ans, de nombreuses études agronomiques ont essayé d'analyser les effets des différentes pratiques culturales sur le développement de la fusariose, pour définir des stratégies de culture limitant cette maladie et la contamination qui peut en résulter. Ainsi, certaines pratiques agricoles sont réputées plus "à risque" que d'autres (par exemple, la culture d'une variété sensible sur un sol non labouré, à la suite d'une culture sensible comme le maïs). Cependant, les incertitudes qui subsistent concernant l'épidémiologie de la maladie ne permettent pas de comprendre les causes réelles de ces risques. Par exemple, les étapes du développement du champignon sur lesquelles agit telle ou telle pratique ne sont pas clairement déterminés, et le risque pris est en fait mal évalué. D'ailleurs, ces pratiques dites "à risque" n'ont pas systématiquement des effets négatifs, et pour les pratiques moins étudiées, comme la fertilisation, les résultats des différentes études ne sont pas toujours cohérents entre eux. La variabilité des conclusions trouvées dans la littérature résulte probablement de plusieurs facteurs : (i) l'influence du climat sur les effets des pratiques culturales, (ii) la variabilité des conditions d'inoculation, sur le plan qualitatif (méthode d'inoculation et espèces inoculées) comme sur le plan quantitatif (quantité d'inoculum), (iii) le manque de prise en compte des interactions entre pratiques culturales, et enfin (iv) la diversité, d'une étude à l'autre, des niveaux d'attaque par la fusariose (et/ou de contamination par les mycotoxines). Concernant ce dernier point, les résultats présentés dans la littérature ont souvent été obtenus pour des gammes de niveaux d'attaque ou de contamination très variables : selon les études, les "intensités" d'attaque des épis varient entre 60 et 80% (Dill-Macky and Jones, 2000), entre 3 et 36% (Teich and Nelson, 1984), ou encore entre 0 à 3% (Cromey *et al.*, 2002), tandis que les contaminations en déoxynivalénol peuvent varier entre 6500 et 15600 µg/kg (Dill-Macky and Jones, 2000), ou entre 0 et 32500 µg/kg (Cromey *et al.*, 2002).

En outre, dans toutes ces études, les symptômes de la maladie visibles sur les épis et la contamination des grains par les mycotoxines sont rarement étudiés de façon conjointe, et très peu d'études s'attachent à identifier les espèces de champignons présentes sur les parcelles. On peut cependant penser que cette identification des espèces présentes constitue un facteur important pour la compréhension de la fusariose, puisque toutes les régions du monde ne sont pas nécessairement attaquées par le même complexe de pathogènes. Ainsi, au Canada, *M. nivale* n'existe pas (Ouellet, *com. pers.*), *F. graminearum* est de loin l'espèce la plus courante (Parry *et al.*, 1995 ; Hooker *et al.*, 2002), et la majorité des isolats de *F. graminearum* sont potentiellement producteurs de déoxynivalénol (Mirocha *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1991 ; Placinta *et al.*, 1999 ; Hooker *et al.*, 2002) mais pas de nivalénol (Mirocha *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1991 ; Carter *et al.*, 2002). En Europe, il existe au contraire une très grande diversité d'espèces et de toxines (Bottalico, 1998). Cette diversité, conjuguée à la diversité des mécanismes de résistance des variétés de blé, va inévitablement influencer fortement -et complexifier- les relations symptômes/toxines si elles existent.

Lacunes dans les connaissances sur le cycle de la maladie, incertitudes sur les effets des pratiques agricoles, rareté des analyses conjointes symptômes/toxines et absence fréquente de la prise en compte des caractéristiques génétiques des agents pathogènes : voilà quatre constats qui vont conditionner notre propre abord du problème.



## Chapitre 2 : Problématique

L'objectif du programme de recherche auquel se rattache cette thèse est, à terme, la définition de "systèmes de culture" permettant de minimiser les attaques de fusariose de l'épi et le risque sanitaire associé aux mycotoxines fusariennes. On définit un "système de culture" comme l'ensemble des modalités techniques (des "pratiques culturales") mises en œuvre sur les parcelles cultivées. Ainsi, chaque système de culture se caractérise par la nature des cultures et leur ordre de succession, et par les "itinéraires techniques" (ensemble des pratiques culturales mises en place sur une année dans une parcelle) appliqués à chacune de ces cultures tout au long de l'année (Sebillotte, 1990). Pendant longtemps, l'évolution des systèmes de culture s'est faite de façon empirique, grâce aux observations des agriculteurs eux-mêmes. Aujourd'hui, un tel ajustement progressif des systèmes de culture par les agriculteurs est devenu quasiment impossible, du fait de la complexité des objectifs poursuivis (productivité, mais aussi préservation de la fertilité des milieux et de l'environnement, qualité sanitaire et technologique des récoltes...), de l'accroissement des moyens techniques disponibles (et de l'accélération des changements techniques), des incertitudes économiques et sociales et du poids des contraintes administratives. Améliorer un système de culture nécessite désormais le plus souvent une analyse extérieure, un "diagnostic agronomique", pour évaluer ce système et concevoir de nouveaux modes de production, en gardant à l'esprit que les modalités techniques successives appliquées sur une parcelle résultent de décisions fortement liées les unes aux autres, et qu'elles influent donc sur l'environnement de la plante cultivée de façon interdépendante (Meynard *et al.*, 2001) ; par exemple, le choix de la variété de blé semée est déterminant pour définir de manière cohérente la date de semis, la densité de semis et l'application d'un traitement protecteur sur la culture.

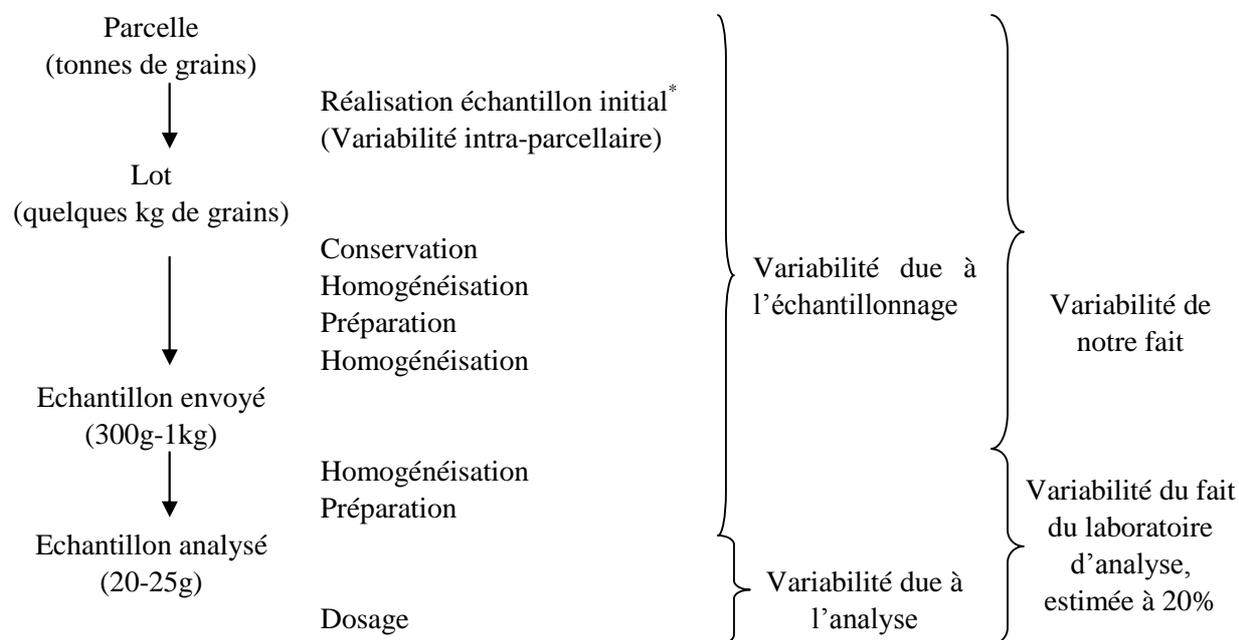
Un diagnostic agronomique a pour vocation d'identifier et de "hiérarchiser" les actes techniques, les caractéristiques environnementales d'une culture, et les interactions entre tous ces paramètres qui sont responsables d'un problème agronomique donné, ainsi que les processus à prendre en compte pour pouvoir piloter l'amélioration du système (Doré *et al.*, 1997) : il s'agit de comprendre la multiplicité des interactions pour déterminer les causes réelles des problèmes (Meynard and David, 1992) et pour identifier les techniques culturales sur lesquelles peut ou doit porter l'amélioration technique (Sebillotte, 1978a). L'examen de la littérature ayant indiqué que les effets des pratiques culturales étaient actuellement encore insuffisamment connus, nous avons tenté de réaliser un tel diagnostic agronomique, pour mieux comprendre les effets des pratiques agricoles et de leurs interactions sur le développement de la fusariose de l'épi de blé, les niveaux de contamination en toxines et la relation entre ces deux variables.

Comme annoncé en introduction, nos résultats sont présentés dans trois chapitres distincts :

- *La définition de procédures d'échantillonnage pour le dosage des mycotoxines*
- *La caractérisation des relations entre les symptômes de fusariose, la production de toxines et les pratiques agricoles*
- *L'apport d'une caractérisation génétique des populations de *Fusarium* contaminantes, à la compréhension des effets des pratiques culturales*

Le choix de ces trois points, et la manière de les traiter, seront argumentés dans les paragraphes ci-dessous.

**Figure 2-1 : Histoire d'un échantillon de grains, du prélèvement à l'analyse**



\* "Réalisation échantillon initial" comprend la date de prélèvement, le choix des organes sur lesquels la contamination est déterminée, et le mode de prélèvement

## 1- Analyse des procédures d'échantillonnage pour le dosage des mycotoxines

Réaliser un diagnostic agronomique (étude des effets des pratiques culturales) nécessite l'étude de parcelles de grande taille et en nombre important. A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature de données ou de recommandations concernant les procédures d'échantillonnage pour la détermination des niveaux de contamination par les toxines lors d'expérimentations agronomiques. Il nous a donc semblé nécessaire, en préalable à notre diagnostic agronomique, de réfléchir à ces procédures. Cette question se pose d'autant plus que la contamination par les toxines des parcelles (Raimbault *et al.*, 2002) et des lots récoltés (Whitaker and Wiser, 1969 ; GIPSA, 1999 ; Hart and Schabenberger, 1999 ; Codex Alimentarius Commission, 2001 ; Armitage, 2003) est susceptible d'être très hétérogène. L'objectif est de définir les différences de teneurs en toxines qui pourront être considérées comme statistiquement significatives, préalable nécessaire à un classement des parcelles selon leurs niveaux de contamination.

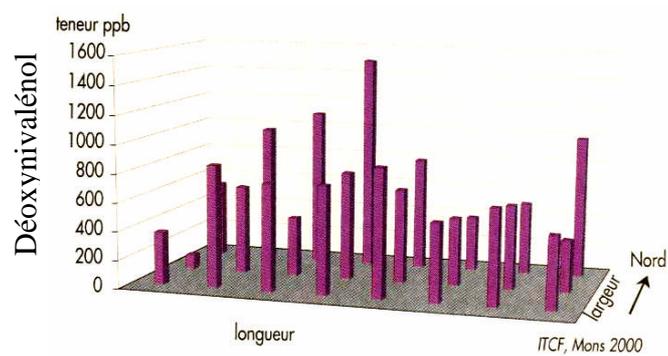
Chaque dosage de toxines est sujet à des biais induisant une certaine variabilité (**Figure 2-1**). Cette variabilité peut avoir pour origine une variabilité intrinsèque à l'analyse (selon la personne qui fait l'analyse, selon la méthode d'analyse, l'appareillage...) et/ou une variabilité intrinsèque à l'échantillon lui-même. La variabilité intrinsèque à l'analyse peut être estimée par le laboratoire d'analyse, mais aucun élément connu ne permet d'estimer la variabilité intrinsèque à l'échantillon : celle-ci résulte du fait que le lot de grains récolté peut être peu représentatif de l'ensemble du champ, que l'échantillon analysé peut être peu représentatif du lot de grains récoltés, ou encore que l'échantillon analysé peut avoir été mal homogénéisé.

La *première étape* du protocole (**Figure 2-1**) est le prélèvement de lots. Cette étape requiert une multitude de décisions : il faut choisir la date du prélèvement, sa localisation dans le champ, les organes à prélever et le mode de prélèvement.

En ce qui concerne la date du prélèvement et les organes sur lesquels l'analyse doit être réalisée, les études déjà publiées sur la résistance de diverses variétés ont montré que pour certains génotypes les teneurs en déoxynivalénol n'étaient ni constantes au cours du remplissage des grains, ni ne suivaient une évolution linéaire : lors d'une infection artificielle, il semble par exemple que la toxine soit d'abord produite en quantité importante, jusqu'à ce qu'un pic soit atteint au bout de 6 semaines, puis la quantité produite diminue naturellement jusqu'à ce que l'on atteigne une concentration en toxine restant constante jusqu'à la récolte (Miller and Young, 1985b ; Savard *et al.*, 2000). Les déterminants de la production de mycotoxines (date de début de contamination, migration des toxines), ainsi que d'autres déterminants, à ce jour inconnus, de l'évolution des teneurs en toxines dans les plantes n'étant pas encore identifiés, selon les différentes variétés de blés cultivés, il nous a semblé intéressant de doser les toxines présentes à différents stades du remplissage des grains et sur les différents organes de l'épi (ceci également dans la perspective - à plus long terme - de pouvoir prédire la contamination en mycotoxines d'une culture avant sa récolte).

En ce qui concerne la localisation et le mode de prélèvement, l'Institut Technique des Céréales et des Fourrages (aujourd'hui Arvalis-Institut du végétal), s'est intéressé (pendant l'année 2000) à la question de la distribution sur une parcelle de dix hectares de la contamination par le déoxynivalénol produit par les champignons présents sur la culture (Raimbault *et al.*, 2002). Dans cette étude, la parcelle était divisée en 24 surfaces élémentaires de 4100 m<sup>2</sup>, et un lot de grains était collecté sur chacune de ces surfaces élémentaires. La teneur des grains en déoxynivalénol était déterminée, pour chaque lot, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les mesures ayant été réalisées au laboratoire d'analyse de l'ITCF. Les résultats de cette étude, présentés

**Figure 2-2 : Teneur en déoxynivalénol de surfaces élémentaires, à l'intérieur d'une parcelle de 10 ha**



3 x 8 Surfaces élémentaires de 4100 m<sup>2</sup> chacune, d'après Raimbault *et al.* (2002)

sur la **Figure 2-2**, montrent une très forte hétérogénéité entre les différents lots, pourtant récoltés dans la même parcelle : les niveaux de contamination des lots récoltés varient de 10 à 1475 µg de déoxynivalénol/kg de grains. Cette variabilité des niveaux de contamination à l'intérieur d'une même parcelle, si elle était confirmée, serait particulièrement préoccupante, et suggère, au minimum, qu'une très grande attention doit être donnée à la qualité de l'échantillonnage au sein d'une parcelle. En effet, la parcelle correspondant (i) à l'unité de travail sur laquelle l'agriculteur intervient et met en place son système de culture (en agriculture fortement artificialisée, mais hors agriculture de précision) et (ii) à la plus petite entité traçable lors de la collecte des grains, elle est donc une échelle d'étude très importante pour les deux thématiques de notre recherche que sont la protection intégrée et la sécurité sanitaire. Cependant, une telle hétérogénéité de distribution de la contamination n'a été, à notre connaissance, observée, ou du moins publiée, que dans cette seule étude. Et n'ayant guère les moyens de suivre toute la parcelle dans notre diagnostic, nous avons choisi de ne pas concentrer nos forces de travail sur l'étude de la variabilité intra-parcellaire. Par ailleurs, des différences de contamination entre différentes parcelles restent objectivables et semblent significatives, laissant supposer qu'une réelle variabilité existe d'une parcelle à une autre, malgré une probable variabilité intra-parcellaire (Fourbet *et al.*, 2001).

Dans le domaine de la contamination des lots de grain par les aflatoxines, l'Union Européenne a déjà défini une procédure portant sur le mode de prélèvement des échantillons lors des contrôles du taux de ces mycotoxines dans les grains : c'est la directive 98/53/CE, modifiée par la directive 2002/27/CE. Comme les aflatoxines, les toxines fusariennes doivent probablement se présenter de façon très hétérogène au sein d'un lot donné. Pour nos travaux, il a donc été décidé que quand ce serait possible, c'est-à-dire lors d'une récolte à la moissonneuse-batteuse, nos modalités d'échantillonnage seraient directement inspirées de ces directives. Toutefois, les diagnostics en parcelles agricoles amènent le plus souvent à prélever des échantillons à partir de petites surfaces, appelées placettes, supposées représentatives de surfaces plus grandes, et en quantité suffisamment faible pour ne pas porter préjudice à la récolte de l'agriculteur (par exemple David, 2004, Van Keer, 2003, pour ne prendre que des exemples récents) : ce mode d'échantillonnage est réputé ne pas introduire d'incertitude importante sur l'estimation de la valeur des composantes du rendement. Compte tenu de l'hétérogénéité au sein d'une même parcelle évoquée ci-dessus pour la teneur en déoxynivalénol des grains de blé, il nous est apparu nécessaire de prévoir de comparer la méthode de base par échantillonnage à la suite d'une récolte mécanique, à une méthode par échantillonnage manuel à partir de placettes ou de bottillons d'épis. On verra au chapitre 4 que les deux méthodes aboutissent à des résultats voisins, ce qui permet d'exclure une trop grande hétérogénéité des contaminations sur nos parcelles.

La *seconde étape* du protocole (**Figure 2-1**) concerne la conservation des grains. Comme les mycotoxines fusariennes sont produites avant la récolte et sont réputées thermiquement stables (Vidal, 1990 ; Quillien, 2002), on pourrait s'attendre à ce que les teneurs en toxines dans les grains restent identiques pendant la conservation. Cependant, certaines voix commencent à s'élever pour dire que les niveaux de contaminations pourraient bien évoluer au cours du stockage (Grosjean, *com. pers.*). Par ailleurs, compte tenu de l'ampleur du travail de récolte des lots de grains sur un réseau de parcelles, un certain laps de temps peut s'écouler entre la récolte du lot et la préparation de l'échantillon. Il nous a donc semblé également important d'évaluer les effets du stockage des grains (différents moyens de conservation, différentes durées) sur les niveaux de contaminations en mycotoxines. Pour cela, nous comparerons la teneur en toxines obtenue après conservation à celle dosée immédiatement après récolte (chapitre 4).



La *troisième étape* du protocole traite du mode de préparation des échantillons de chaque lot. Si la littérature n'établit pas de mode de préparation type pour les échantillons destinés à l'analyse des mycotoxines fusariennes du blé, elle s'accorde néanmoins sur certaines procédures. Ainsi, moudre l'échantillon est un facteur réputé important pour la fiabilité des résultats (Hart, 1998 ; Whitaker *et al.*, 2000 ; Whitaker, 2003). Pour alimenter la recherche sur cette étape du mode de préparation des échantillons, nous avons comparé la variabilité du dosage des toxines (appréhendée par le dosage de plusieurs échantillons d'un même lot) après différents modes de préparation de ces échantillons.

La *quatrième étape* de la procédure d'échantillonnage correspond à l'homogénéisation de l'échantillon. Cette étape suscite une nouvelle interrogation, dans la mesure où les grains les plus attaqués par les champignons sont généralement les plus petits, et que les poussières de grains ou d'enveloppes de grains sont également réputées plus contaminées que les grains eux-mêmes (laboratoire d'analyse Qualtech, *com. pers*). Nous avons donc évalué cette source de variabilité, qui s'est effectivement révélée très importante à bien contrôler (**Chapitre 4**). Quant à l'homogénéisation proprement dite de l'échantillon, elle est faite par le laboratoire dans lequel nos analyses ont été réalisées (Qualtech), et ne pose *a priori* pas de problème (3 passages sur un mélangeur-diviseur). Le laboratoire d'analyse estime à 20 % l'incertitude du dosage final des trichothécènes ; cette estimation est le résultat de plusieurs analyses faites par différents opérateurs à des dates différentes sur un même échantillon. Le dosage étant destructeur pour l'échantillon analysé (20-25g), l'estimation est faite sur plusieurs aliquots de l'échantillon envoyé et donc à la suite d'une nouvelle homogénéisation de l'échantillon envoyé. Elle prend de ce fait en compte les "erreurs" d'homogénéisation.

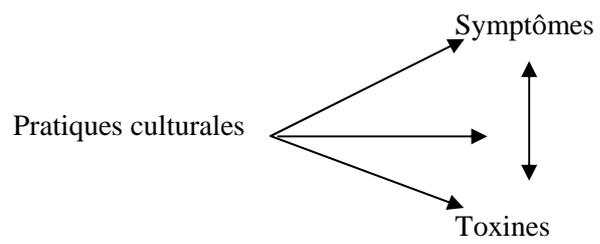
Dans le chapitre 4, nous comparerons donc finalement différentes dates de récolte et d'analyse, différentes méthodes de récolte, divers modes de préparation d'échantillon, ainsi que les effets de ces préparations sur la variabilité des dosages en mycotoxines.

## **2- Caractérisation des relations entre les symptômes de fusariose, la production de mycotoxines, et les pratiques agricoles**

Les conséquences des modes de conduite du blé sur les symptômes de fusariose de l'épi et/ou la production de mycotoxines sont généralement étudiées selon deux angles.

Un premier axe de recherche, le plus fourni (Teich, 1989 ; Parry *et al.*, 1995) et celui qui a été le plus détaillé dans l'analyse bibliographique du chapitre 1, concerne les effets des pratiques culturales sur l'apparition des symptômes de la maladie et/ou la production de toxines. Ces études possèdent, comme nous avons déjà commencé à l'évoquer, trois grandes limites. Ce sont d'abord, le plus souvent, des essais réalisés dans des parcelles expérimentales, qui sont des milieux particuliers, différents des champs cultivés. Ensuite, une infection artificielle y est généralement réalisée, et l'introduction d'une espèce particulière de champignon perturbe alors la diversité naturelle du complexe de pathogènes. Enfin, même dans les études réalisées en plein champ, le nombre de pratiques culturales dont les effets sont étudiés est très limité (rarement plus de deux), et les effets de ces diverses pratiques sont analysés indépendamment les uns des autres. Il en découle que les résultats obtenus ne peuvent pas être directement transposés aux conditions agricoles de plein champ : en effet, dans les systèmes de culture appliqués par l'agriculteur à ses champs, les pratiques agricoles sont liées, la modification de l'une d'entre elles entraîne d'autres modifications, et des compensations d'effets sont alors possibles. Ces études ont également pour inconvénients, (i) parce qu'elles sont menées en station expérimentale, de ne pas couvrir les gammes de variation rencontrées en parcelles agricoles, et (ii) à cause du trop petit nombre de pratiques culturales prises en compte, de ne pas permettre d'identifier les pratiques culturales qui jouent un rôle déterminant sur la production de mycotoxines.

**Figure 2-3 : Relations étudiées par les diagnostics agronomiques**



**A → B : effet de A sur B**

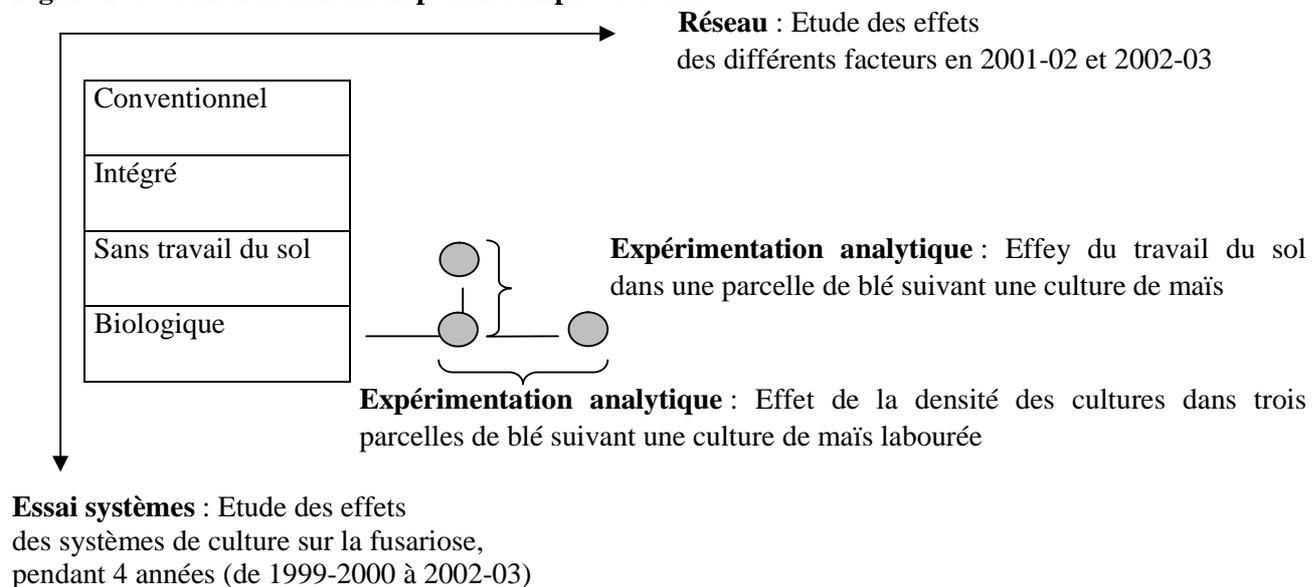
Un second axe de recherche concerne la sécurité sanitaire des grains, ou à l'inverse les risques alimentaires dus aux toxines qu'ils contiennent. Les études menées selon cet axe peuvent être réparties en deux groupes. Les premières, généralement conduites par des sociétés phytosanitaires ou, par exemple, par l'Institut Technique de l'Agriculture Biologique (ITAB, 2000), analysent les denrées alimentaires (alimentaires ou humaines) plus ou moins transformées : cette analyse évalue les teneurs en toxines dans les silos de stockage ou dans les produits transformés (donc après mélange des grains de plusieurs parcelles), et agrège donc toute une gamme de pratiques culturales dans un type donné de système de culture. Cela permet, par exemple, la comparaison de contaminations en agriculture biologique *versus* agriculture conventionnelle. Les secondes (par exemple les plans de surveillance de la DGAL, de l'AFSSA, de la DGCCRF) évaluent les teneurs en toxines présentes sur différentes parcelles cultivées avec un type donné de système de culture (conventionnel, biologique...), mais ne recensent pas non plus les différents éléments composant chaque système de culture (variétés, successions culturales différentes...), ni les conditions environnementales rencontrées. Ces études permettent d'évaluer la production des mycotoxines à différents moments, de la récolte jusqu'à l'obtention du produit fini, mais ne permettent que de comparer de façon très globale les différents modes de conduite, sans possibilité de comprendre et/ou d'identifier les causes des différents niveaux de contamination par les mycotoxines, ni de déterminer la diversité prospectée des systèmes de culture.

De notre côté, nous espérons, grâce à la méthode du diagnostic agronomique régional (Doré *et al.*, 1997), identifier et hiérarchiser les actes techniques (et les interactions entre eux et avec l'environnement) qui influent sur l'expression de la fusariose de l'épi et/ou les teneurs en mycotoxines des grains à la récolte. Nous avons donc choisi d'étudier la variabilité des symptômes de fusariose et des niveaux de contamination en mycotoxines *en parcelles agricoles* et *sous contamination naturelle* dans une région productrice de blé. Nous avons pour cela choisi des parcelles permettant de "couvrir" la variabilité du milieu et la diversité des systèmes de culture mis en œuvre sur cette région, pour y suivre les modalités techniques successives appliquées sur les parcelles et y recueillir les différents paramètres environnementaux des cultures.

Nous nous sommes cependant intéressés principalement (mais pas exclusivement, voir plus loin) à des cultures menées sans fongicides, et ce choix initial mérite une explication. L'efficacité et les effets des traitements fongicides en parcelles agricoles s'avèrent très variables en fonction des molécules utilisées (Parry *et al.*, 1995 ; Mesterhazy and Bartok, 1996 ; Homdork *et al.*, 2000). Or les stratégies de protection fongicide peuvent fortement différer entre parcelles. Dès lors, un travail dans des parcelles avec protection fongicide entraînerait un "bruit de fond" important, risquant de masquer les effets des autres techniques. Pour étudier les effets des diverses pratiques agricoles au sein de systèmes cohérents, sans introduire de variabilité à cause des fongicides, nous avons donc choisi de réaliser l'essentiel de notre diagnostic agronomique sur des parcelles agricoles conduites selon un système d'agriculture biologique. Notons au passage que l'agriculture biologique n'est qu'un cas particulier de culture sous protection intégrée. Nous avons fait l'hypothèse (sur laquelle nous reviendrons lors de la discussion générale de ce travail) que les résultats obtenus seraient transposables, sans trop de difficultés, du système de culture biologique au système conventionnel.

Sur les différentes parcelles suivies dans notre diagnostic agronomique, l'étude conjointe des symptômes de fusariose et de la présence de mycotoxines devrait nous permettre de mettre en évidence les relations entre symptômes visibles et toxines contaminantes, entre pratiques culturales et contamination par les toxines, entre pratiques culturales et symptômes visibles, ainsi que les relations entre pratiques culturales et la relation symptômes-toxines (**Figure 2-3**), et ce dans des conditions de contamination naturelle en plein champ.

**Figure 2-4 : Construction du dispositif complet d'étude**



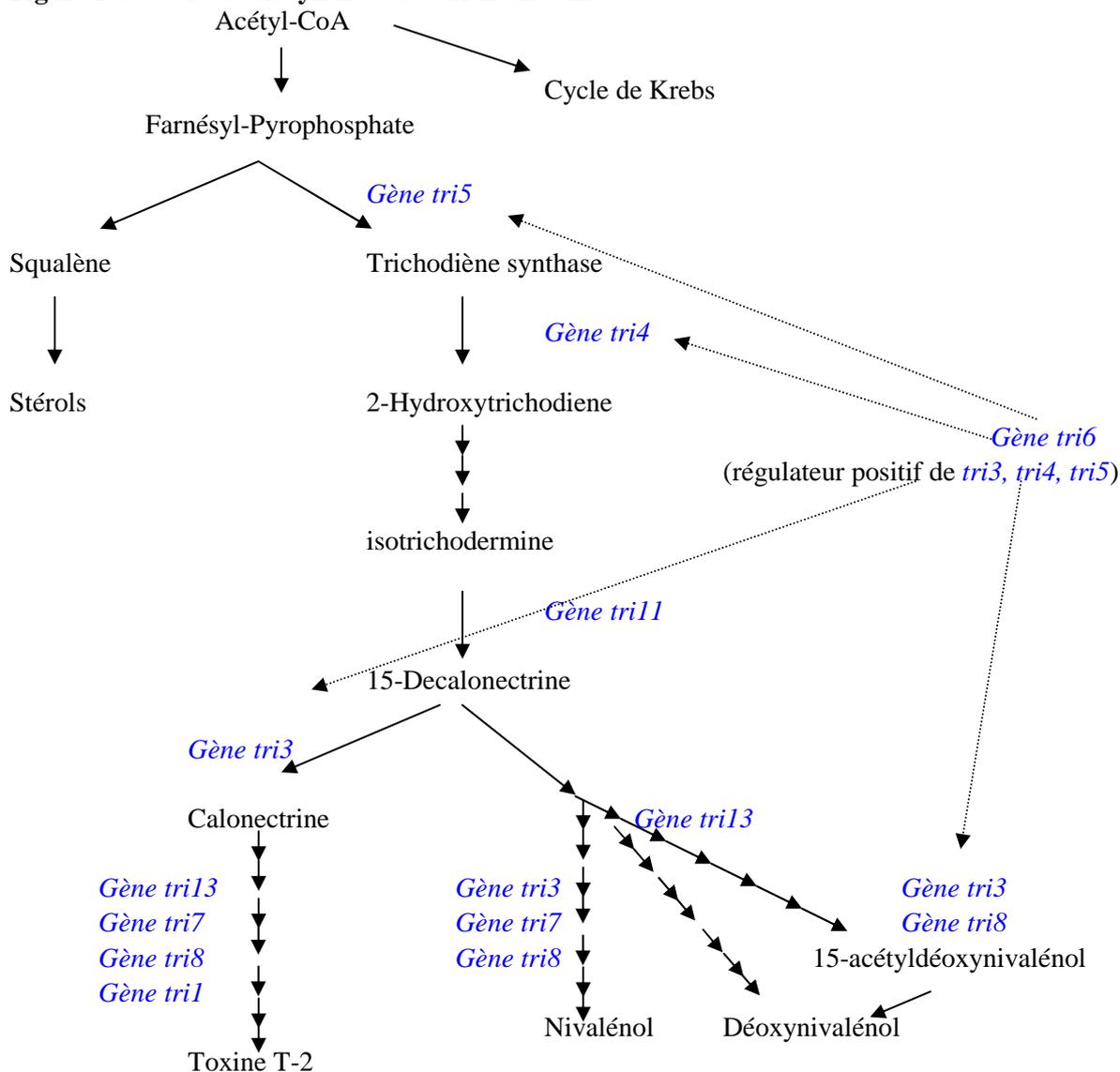
La relation symptômes-toxines qui est explicitement envisagée dans la **Figure 2-3**, est légitimée par le fait que les années à forts niveaux de symptômes sont également des années à forte production de mycotoxines. De plus, des études menées après contamination artificielle par une seule espèce de champignon (Teich *et al.*, 1987 ; Teich, 1989 ; Snijders and Perkowski, 1990e ; Homdork *et al.*, 2000 ; Hestbjerg *et al.*, 2002), ou encore sous contamination naturelle avec de très forts niveaux de maladie (Teich and Hamilton, 1985 ; Dill-Macky and Jones, 2000), confirment l'existence d'une corrélation entre les symptômes de la maladie et la teneur des grains en déoxynivalénol. Cette relation, comme nous l'avons évoqué au chapitre 1, n'est cependant pas observée dans tous les cas de contamination (naturelle ou artificielle) par plusieurs espèces de champignons (Birzele *et al.*, 2002 ; Magan *et al.*, 2002). De plus, en milieu naturel, il ne semble pas y avoir de corrélation obligatoire entre la présence de *Fusarium* et la teneur des grains en déoxynivalénol (Ioos and Faure, 2001). Les contradictions de la littérature sur l'existence d'une telle relation amènent à émettre différentes hypothèses : (i) une corrélation symptômes-toxines pourrait n'exister qu'en conditions de très forte contamination, (ii) cette corrélation pourrait n'exister que pour certaines conditions climatiques, qui influenceraient le développement de certaines espèces de champignons, (iii) cette corrélation pourrait n'exister que dans certains systèmes de culture. Statuer à la fois sur l'existence d'une corrélation entre les symptômes et les toxines et sur les conditions de son existence est essentiel pour la compréhension du développement de la fusariose et la prévision des teneurs en déoxynivalénol dans les grains, et donc pour la conception d'itinéraires techniques limitant les contaminations. Cette étude constitue une part importante de ce travail de thèse et sera présentée au chapitre 5. Par ailleurs comme on le verra dans le chapitre 6, nous avons inclus des efforts de caractérisation détaillée des différentes espèces de champignons responsables de la fusariose.

Pour notre travail de thèse, nous avons finalement choisi d'étudier ces hypothèses à partir de trois types de dispositifs (**Figure 2-4**) :

- Un réseau de parcelles agricoles en culture biologique : un tel réseau est la base de tout diagnostic agronomique, qui consiste, comme nous l'avons dit, à évaluer l'impact des systèmes de culture (pratiques culturales et leurs interactions mutuelles) dans une large diversité de milieux et d'itinéraires techniques.
- Des expérimentations plus analytiques (dans la mesure de nos moyens et de notre temps), pour répondre aux questions qui nous semblaient les plus intéressantes et les moins documentées dans la littérature. Ces essais ponctuels, toujours réalisés dans un système de production biologique, ont eu également pour objectif de disposer de nouveaux éléments pour interpréter correctement certaines des observations faites sur les parcelles du réseau (Boiffin *et al.*, 1981 ; Doré *et al.*, 1997), notamment sur le rôle (insuffisamment connu) des adventices, de la densité de semis, de l'azote....
- A ces deux dispositifs, classiques d'un diagnostic agronomique, nous avons ajouté l'exploitation d'un "essai systèmes" de longue durée (décrit dans le chapitre 3) qui avait été démarré deux ans auparavant pour comparer différents systèmes de culture conduits de façon cohérente ou non. Cet essai systèmes présente l'intérêt de permettre la comparaison des niveaux d'attaque et de contamination (i) dans un même environnement (même sol, même climat) au sein d'une même année et (ii) sur plusieurs années, et donc d'évaluer l'influence du climat.

Le réseau de parcelles et l'essai systèmes de longue durée sont complémentaires dans la mesure où le deuxième permet de rendre compte d'un effet climat sur 4 ans en un même lieu, et le premier sur 2 ans seulement mais en cinq lieux différents. De plus, l'essai de longue durée devrait permettre de vérifier les hypothèses faites d'après les résultats obtenus sur le réseau de parcelles.

Figure 2-5 : Voie de biosynthèse des trichothécènes



D'après différents travaux présentés dans Bakan (1998) et l'UR Mycologie et sécurité des aliments de l'INRA de Bordeaux.

### 3- Contribution d'une caractérisation génétique des populations de *Fusarium* à la compréhension des effets des pratiques culturales

Le diagnostic agronomique que nous nous proposons de réaliser est destiné à s'appliquer non pas à une question relative au rendement (la variable la plus fréquemment analysée dans les diagnostics agronomiques) de nos cultures de blé, mais à une maladie de l'épi, la fusariose, phénomène complexe et caractérisé par deux variables potentiellement liées entre elles : la présence de symptômes révélateurs d'une contamination par la fusariose d'une part, et la production de toxines d'autre part. A la suite de l'analyse bibliographique réalisée et présentée au chapitre 1, il apparaît que la relation associant ces deux variables n'est pas clairement établie : certaines études montrent l'existence d'une corrélation, alors que d'autres n'en montrent pas. Ceci peut probablement s'expliquer, au moins en partie (et en plus des trois hypothèses énoncées précédemment), par la variabilité des populations de pathogènes infectants. En effet, la littérature (**Chapitre 1**) montre (i) que les symptômes de fusariose peuvent être liés à la présence de plusieurs genres de champignons, et à l'intérieur de ces genres, à des espèces différentes, (ii) que ces diverses espèces présentent des aptitudes différentes à la production de toxines, et (iii) qu'au sein d'espèces réputées productrices, différentes souches ont des aptitudes génétiques très différentes quant à la nature et au niveau de production de toxines. Ainsi, les espèces de *F. graminearum* et *F. culmorum* présentent différentes capacités génétiques de production de mycotoxines, parfois appelées des chémotypes. De plus, la voie de biosynthèse des toxines est fort longue (**Figure 2-5**), et de nombreux gènes, s'ils sont altérés, peuvent influencer la capacité de production des toxines de la souche. Ainsi, par exemple, si les gènes *tri7* et *tri13* sont non fonctionnels, la souche se trouve dans l'incapacité génétique de produire du nivalénol (Nicholson *et al.*, 2003).

Comme nous l'avons brièvement noté à la fin du chapitre 1, les diverses souches de pathogènes n'ont pas toutes la même répartition géographique. Ainsi, il est important de garder à l'esprit que la situation française est assez différente de celle de l'Amérique du Nord, où *F. graminearum* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée sur les cultures (Parry *et al.*, 1995 ; Hooker *et al.*, 2002), alors que notre pays (et plus largement toute l'Europe) est soumis à une très grande diversité de champignons susceptibles d'être responsables de la fusariose : deux genres de champignons, et dans le genre *Fusarium*, plus d'une dizaine d'espèces.

Le **Tableau 2-1** présente la distribution géographique des espèces les plus fréquemment rencontrées, avec leurs capacités toxigènes spécifiques, notamment pour *F. graminearum* et *F. culmorum*. Les cultures Nord-Américaines ne semblent être infectées que par l'espèce *F. graminearum*, avec un seul chémotype (production potentielle de déoxynivalénol et 15-acétyldéoxynivalénol) (Mirocha *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1991). Au contraire, en Europe, plusieurs chémotypes sont présents : déoxynivalénol, 3-acétyldéoxynivalénol et nivalénol sont les trois toxines les plus fréquentes, avec également la zéaralénone et le 15-acétyldéoxynivalénol (Bottalico, 1998 ; Placinta *et al.*, 1999 ; Hestbjerg *et al.*, 2000 ; Bottalico and Perrone, 2002). A ce tableau, il faut ajouter que (i) quelques souches de *F. culmorum* ont été identifiées comme ne produisant aucune toxine (Bakan *et al.*, 2001) ; (ii) d'autres souches, de *F. culmorum* en France (Bakan *et al.*, 2001) ou de *F. graminearum* aux Etats-Unis (Mirocha *et al.*, 1989), ont révélé une capacité à produire du déoxynivalénol et ses deux dérivés : 3- et 15-acétyldéoxynivalénol. La très grande diversité des genres, des espèces et des chémotypes présents sur les parcelles françaises et européennes va pouvoir entraîner de nombreux profils d'agents infectieux et des productions de toxines très diversifiées.

On peut alors émettre plusieurs hypothèses pour expliquer l'absence de corrélation mise en évidence entre les niveaux d'attaque de fusariose et de contamination des grains par déoxynivalénol en France (Fourbet *et al.*, 2001), en Angleterre (Magan *et al.*, 2002) ou en Allemagne (Birzele *et al.*, 2002) :

**Tableau 2-1 : Répartition géographique de différentes espèces de champignons et caractérisation de leur capacité toxigène**

	Champignons responsables de la fusariose	Régions de présence	Toxines potentiellement produites	Nature du potentiel toxigène
<b>Genre</b>	<i>Microdochium</i>	Europe <sup>c,d</sup>	Aucune	Non définie au niveau du genre des champignons
	<i>Fusarium</i>	Monde	Nombreuses (Bottalico, 1998)	
<b>Espèces les plus courantes (toutes présentes en France)</b>	<i>M. nivale nivale</i>	Europe <sup>c</sup>	Aucune	Les études interspécifiques caractérisent la nature de la production de toxine mais pas d'espèces plus ou moins fortement productrices
	<i>M. nivale majus</i>	Europe <sup>c</sup>	Aucune	
	<i>F. graminearum</i>	USA, Canada, Australie, Europe <sup>b</sup>	<b>DON, ZEN, NIV, FUS, AcDON, DAcDON, DAcNIV</b> <sup>a</sup>	
	<i>F. culmorum</i>	Europe <sup>c,d</sup>	<b>DON, ZEN, NIV, FUS, ZOH, AcDON</b> <sup>a</sup>	
	<i>F. poae</i>	Europe <sup>c</sup>	<b>DAS, MAS, NIV, FUS, T2, HT2, NEO</b> <sup>a</sup>	
	<i>F. avenaceum</i>	Monde <sup>e</sup>	<b>MON</b> <sup>a</sup>	
<b>Souches</b>	<i>F. graminearum</i> <sup>f</sup>	Chine, New Zélande Europe, Australie	DON + 3-AcDON IA <sup>g</sup> : chémotype IA	Au sein des espèces, on a constaté que différentes souches peuvent produire différentes toxines (chémotype) et/ou la même toxine en quantités différentes
		USA, Canada, Mexique, Japon	DON + 15-AcDON <sup>h</sup> : chémotype IB	
		Asie, Europe, pas aux USA ou Canada	NIV + Fus <sup>i</sup> : chémotypes II	
	<i>F. culmorum</i> <sup>f</sup>	Europe USA <sup>d</sup> , Canada <sup>d</sup> , France	DON + 3-AcDON IA <sup>g</sup> : chémotype IA DON + 15-AcDON <sup>h</sup> : chémotype IB	

<sup>a</sup> : d'après Bottalico, 1998, en gras les plus courantes : AcDON, mono-acétyldéoxynivalénol ; DAS, Diacétoxyscirpénol ; DON, Déoxynivalénol ; FUS, Fusarénone-X ; HT2, HT2 Toxine ; MAS, Monoacétoxyscirpénol ; MON, Monoliformine ; NEO, Néosolaniol ; NIV, Nivalénol ; T2, T2 Toxine ; ZEN, Zearalénone ; ZOH, Zéaralénol.

<sup>b</sup> : espèce prédominante dans les régions les plus chaudes (Parry *et al.*, 1995 ; Bottalico, 1998)

<sup>c</sup> : espèce prédominante dans les régions plus froides et maritimes (Parry *et al.*, 1995 ; Bottalico, 1998)

<sup>d</sup> : espèce très rare aux Etats-Unis et au Canada (Miller *et al.*, 1991)

<sup>e</sup> : espèce présente sur une large zone climatique (Parry *et al.*, 1995) (plutôt froide que chaude (Bottalico, 1998)), mais qui ne représente qu'une faible proportion des *Fusarium* isolés (Parry *et al.*, 1995)

<sup>f</sup> : des études ont montré des différences d'agressivité selon les souches

<sup>g</sup> : chémotype IA détecté chez *F. graminearum* (Mirocha *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1991), *F. culmorum* (Miller *et al.*, 1991)

<sup>h</sup> : chémotype IB détecté chez *F. graminearum* (Mirocha *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1991), *F. culmorum* (Miller *et al.*, 1991 ; Bakan *et al.*, 2001)

<sup>i</sup> : chémotypes II détecté chez *F. graminearum* (Mirocha *et al.*, 1989 ; Miller *et al.*, 1991 ; Carter *et al.*, 2002)

1. Des espèces différentes sont présentes sur les différentes parcelles (voire sur les différents épis d'une même parcelle) : des espèces responsables de la fusariose de l'épi mais qui ne sont pas toutes potentiellement productrices de toxines ou qui ne produisent pas toutes les mêmes toxines (Mirocha *et al.*, 1989 ; Bottalico, 1998 ; Bakan *et al.*, 2002).

*La détermination des espèces de Fusarium et de Microdochium présentes sur les grains récoltés devrait permettre d'évaluer cette hypothèse.*

2. Des espèces identiques sont présentes sur les différentes parcelles, mais les souches diffèrent. Trois types de souches existent : des souches hyperproductrices (Cahagnier, 2002) ou au contraire non productrices (Sutton, 1982 ; Mirocha *et al.*, 1989 ; Jin and Yoshizawa, 1994 ; Bakan, 1998 ; Galtier *et al.*, 2000 ; Ioos and Faure, 2001 ; Walker *et al.*, 2001 ; Bakan *et al.*, 2002 ; Perkowski *et al.*, 2002) des toxines que l'espèce peut normalement produire, ou encore des souches produisant des toxines différentes, c'est-à-dire de chémotypes différents (Mirocha *et al.*, 1989 ; Jin and Yoshizawa, 1994 ; Hestbjerg *et al.*, 2000 ; Cromey *et al.*, 2002 ; Hestbjerg *et al.*, 2002).

*Une identification plus fine de la nature de la souche (potentiel du pouvoir toxigène) devrait permettre d'évaluer cette hypothèse.*

3. Des espèces identiques et des souches aux mêmes capacités génétiques de production sont présentes, mais les conditions environnementales et/ou nutritives diffèrent, et conduisent à des productions de toxines différentes (Sutton, 1982) : il a été en effet observé que la production de toxines par une souche potentiellement toxigène n'était pas systématique (Sutton, 1982 ; Bakan, 1998 ; Marin *et al.*, 1999 ; Ioos and Faure, 2001 ; Cahagnier, 2002), les conditions de température et d'humidité (tout comme les stress nutritionnels) contrôlant, dans une certaine mesure, la production de toxines par ces champignons.

*Une analyse de la composition chimique des parties végétatives et des grains devrait permettre d'évaluer cette hypothèse de couplage entre la production de toxines par une souche et la richesse nutritionnelle du grain. L'étude de la durée de colonisation et du microclimat pendant la colonisation du grain nécessiterait cependant un suivi très fin en milieu contrôlé, que nous ne pouvons pas assurer en parcelles agricoles.*

4. Des espèces identiques, des souches identiques, des conditions environnementales et nutritives identiques, mais les variétés de blé cultivées ont des résistances différentes : de nombreux travaux indiquent en effet que certains génotypes de blé limitent le développement du champignon dans le grain, et minimisent donc la dégradation des grains et les symptômes observables, tout en étant très tolérants aux mycotoxines (c'est-à-dire que de très fortes doses de toxines peuvent être observées) (Bai *et al.*, 2001). Inversement, un autre type de cultivar peut présenter des symptômes sévères avec de faibles teneurs de mycotoxines (Bai *et al.*, 2001).

*Aucune documentation n'existe sur la résistance aux mycotoxines des différentes variétés de blés cultivées en France. Pour pallier cette lacune, on ne suivra qu'un nombre restreint de variétés de blé, en tentant de les comparer.*

5. Des espèces identiques, des souches identiques, des conditions environnementales et nutritives identiques, des variétés identiques, mais les champignons pathogènes ne peuvent pas migrer entre les enveloppes du grain et les grains eux-mêmes, c'est-à-dire entre les organes sur lesquels sont observés les symptômes et ceux sur lesquels sont dosés les toxines.

*Cette hypothèse soulève la question de l'existence potentielle d'une voie de migration des champignons et des toxines à l'intérieur de la plante (c'est-à-dire endogène à la plante).*

6. Des espèces identiques, des souches identiques, des conditions environnementales et nutritives identiques, des variétés identiques, une migration des pathogènes depuis les enveloppes jusqu'aux grains théoriquement possible, mais l'efficacité de cette migration est variable selon les parcelles, dépendant des résistances variétales de la plante, des sensibilités à l'attaque du champignon selon le stade de développement de la plante au moment de l'attaque, de



l'interaction entre ces deux paramètres (Mesterhazy, 1983 ; ShouXi and Kleijer, 2001), du climat (Sutton, 1982 ; Chelkowski *et al.*, 2000 ; Blaney and Dodman, 2002 ; Hooker *et al.*, 2002 ; Magan *et al.*, 2002), de la date et de la durée de colonisation, ainsi que de la compétition entre microorganismes (Sutton, 1982 ; Galtier *et al.*, 2000 ; Blaney and Dodman, 2002 ; Magan *et al.*, 2002).

*Cet aspect est très complexe : il fait intervenir différents objets d'étude (champignons, migration de toxines, résistance variétale des plantes), différentes disciplines (pathologie, épidémiologie, toxicologie, génétique), différentes échelles d'étude (au niveau de la cellule, des tissus, des organes).*

Au cours de ce travail, les hypothèses 1 et 2 pourront être testées. L'hypothèse 3 ne pourra être complètement testée, la littérature n'identifiant de différences de potentialité des souches que dans la production de déoxynivalénol (pas pour les autres toxines), c'est-à-dire pour les différentes souches de *F. culmorum* ou *F. graminearum*. Quant à un effet des conditions environnementales et nutritives sur des souches données, la question ne pourra pas être entièrement évaluée mais sera seulement abordée. Faute de connaissances plus fines sur l'épidémiologie de la maladie (notamment la possibilité d'une migration endogène des champignons et des toxines), les autres hypothèses ne le seront pas. Notre travail ne prétend pas ainsi faire le tour de la question du rôle de la variabilité génétique des champignons responsables de la fusariose dans les effets des pratiques culturales sur les contaminations : il constitue seulement une première approche permettant de tester, en conditions d'exploitations agricoles, une première série d'hypothèses.

### Encadré 3-1 : Modes de production en Agriculture Biologique en Ile-de-France

La France est le premier producteur agricole (20%) et céréalier (30%) de l'Union Européenne (universcereales, 2004). La surface agricole utilisée (SAU) représente 54 % du territoire français (soit un peu moins de 30 millions d'hectares) en 2003, dont environ 1/3 est occupé par les céréales (Agreste, 2004). En Ile-de-France 61 % de la SAU (357 500 hectares) sont consacrés à la culture des céréales (draf.ile-de-france, 2004) : la région est un bassin céréalier traditionnel.

En 2001, les surfaces en mode de production biologique couvre 1,4% de la SAU nationale avec un peu moins de 420 000 ha (organic-europe, 2004). Moins de 1% de cette surface cultivée est situé en Ile-de-France. A la fin de l'année 2003, la surface cultivée "bio" en France a franchi la barre des 550 000 ha, soit un peu moins de 2% de la SAU française (Agence bio, 2004). En 2003, les surfaces fourragères représentent 66 % de la surface "bio" totale en France, tandis que 15% (près de 82 090 hectares) sont couverts par des céréales biologiques (Agence bio, 2004). Depuis la campagne 2003, le Bassin parisien est devenu la troisième région productrice de céréales biologiques, derrière l'Ouest et le Centre (ONIC, 2003) : près de 3 300 hectares sont couverts par une production céréalière, soit 90% de la production biologique dans cette région (GAB Ile de France 2004, *com. pers.*).

En ce qui concerne les pratiques culturales employées par les agriculteurs suivis, une préparation du sol rigoureuse est réputée nécessaire avant l'implantation des cultures, afin de réguler au mieux les repousses d'adventices en début de cycle. Ces travaux et les variétés plutôt tardives employées entraînent des semis assez tardifs, souvent après le 15 octobre.

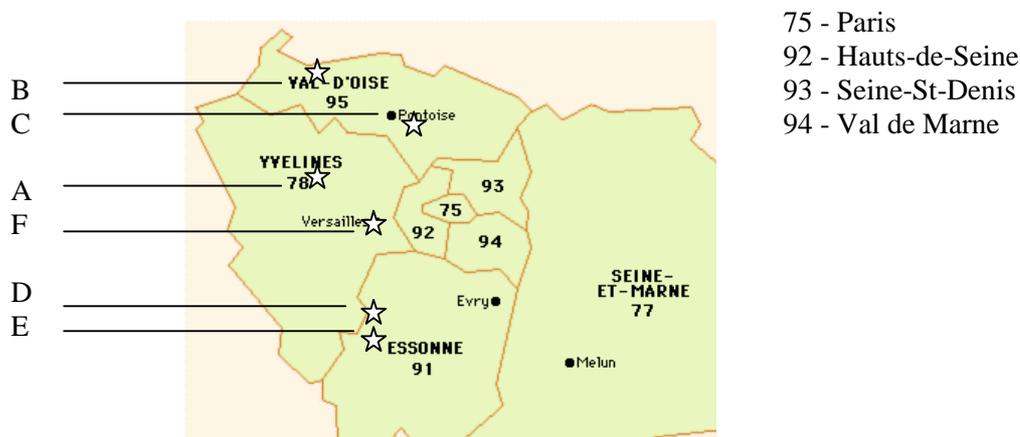
La fertilisation azotée repose essentiellement sur la rotation des cultures : un ou deux ans de céréales suivent généralement 2 à 3 ans de légumineuses ou prairies. Des fertilisations complémentaires peuvent avoir lieu (mais pas nécessairement), selon les opportunités locales offertes aux agriculteurs : compost de déchets verts, fientes de poules ou fumier de bovins avant l'implantation de la culture ou vinasse de betterave. Les farines de plumes ou le guano sont assez peu utilisés du fait de leur coût. Nous ne disposons par ailleurs d'aucune donnée scientifique complète sur la disponibilité réelle des composants fertilisants de ces éléments.

Le désherbage est un élément très important du système de production. Les désherbages se font de façon mécanique, parfois grâce à une houe rotative (en tout début de cycle), plus généralement à l'aide d'une herse-étrille. Un passage peut être effectué à l'automne, mais le désherbage repose essentiellement sur 2 à 3 passages réalisés (en fonction de la densité des adventices et des possibilités d'entrée sur les parcelles) de la fin de l'hiver à la mi/fin-montaison (les cultures sont ensuite trop développées).

Une protection fongicide d'origine naturelle peut être appliquée, essentiellement à base de soufre (qui agit sur la paroi externe des champignons).

De nombreuses variétés sont semées, permettant de diversifier les pressions de sélection sur les parasites et d'étaler dans le temps les différentes périodes de sensibilité aux maladies (et les pointes de travail).

Figure 3-1 : Localisation des exploitations (de A à E) du réseau et de l'essai de longue durée (F)



## Chapitre 3 : Dispositifs, mesures et méthodes d'expérimentation

### 1- Dispositifs expérimentaux

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, trois dispositifs expérimentaux ont été mis en place pour répondre à nos objectifs : un réseau de parcelles agricoles biologiques, des essais expérimentaux factoriels (évaluant l'impact d'une ou deux pratiques culturales) en parcelles agricoles biologiques, et un essai de plus longue durée comparant différents systèmes de culture sur Versailles.

#### 1.1- Réseau de parcelles agricoles

Les sites de l'étude se situent en région Ile-de-France, où l'agriculture biologique est en pleine expansion (**Encadré 3-1**) : on y trouve des exploitations agricoles passées à l'agriculture biologique depuis plus de 20 ans, aussi bien que des exploitations en cours de conversion. Pour autant que soit correcte l'idée que le passage d'un système conventionnel à un système biologique induit une transformation progressive des états chimique, physique et biologique du milieu, l'analyse de parcelles converties à l'agriculture biologique depuis des durées variables devrait permettre d'étudier une large gamme de combinaisons d'états du milieu et du peuplement, susceptibles d'influencer la fusariose (**Encadré 3-1**).

Le réseau de parcelles agricoles biologiques a pour raison d'être de **permettre la compréhension des causes des différences de sensibilité des différentes parcelles vis-à-vis des attaques de fusariose**, et donc, en tenant compte de l'historique de la parcelle et du pédoclimat, il s'agit de :

- caractériser les interactions entre techniques culturales,
- rendre compte de la "variabilité" rencontrée : en terme de symptômes, mycotoxines et espèces,
- hiérarchiser les différents facteurs intervenant dans l'infection par les pathogènes et dans la production de mycotoxines fusariennes.

Pour identifier les rôles respectifs du milieu, des systèmes de culture et de leurs interactions sur les facteurs à l'origine d'une attaque, la méthode du diagnostic agronomique nécessite de disposer d'un dispositif d'évaluation des systèmes de culture couvrant toute la gamme des variables environnementales et des pratiques culturales de la région (Meynard *et al.*, 1996). Sur deux années, 2001-02 et 2002-03, respectivement 15 et 12 parcelles ont ainsi été sélectionnées dans l'ouest de l'Ile-de-France, chez cinq agriculteurs pratiquant l'agriculture biologique (**Figure 3-1**). Ces parcelles couvrent une large gamme de pratiques culturales, et les principales composantes du système de culture de chacune des parcelles suivies sont présentées dans le **Tableau 3-1** : histoire culturelle (culture précédente et antérieure), travail du sol, variété semée, positionnement du cycle dans l'année (dates de semis, floraison et récolte), mode de fertilisation, nombre et moyens de désherbage, traitements fongicides éventuels. L'**Annexe 1** rappelle les principales caractéristiques des variétés présentes dans les dispositifs, à savoir leur précocité, leur hauteur moyenne et leur sensibilité à la fusariose de l'épi.

Sur chaque parcelle, nous suivons une zone représentative de 300 à 400 m<sup>2</sup>, homogène du point de vue climatique, pédologique et géomorphologique, et représentative de la parcelle. Par souci de simplification de langage, ces zones d'environ 300 à 400 m<sup>2</sup> seront appelées "parcelles" dans la suite de ce manuscrit. Sur l'une des parcelles, en outre, deux zones ont été retenues, l'une est labourée et l'autre non (BV versus BVI). Le nombre de variétés semées est réduit, seules les variétés présentes sur

**Tableau 3-1 : Principales caractéristiques des parcelles agricoles biologiques suivies**

Année	Parcelles	Culture antérieure	Culture précédente	Labour	Variété	Date de semis	Date de floraison	Date de récolte	Fertilisation	Nombre de désherbages	Outil de désherbage	Traitement fongicide	
2001-02	AI	Maïs	Féverole	oui	Renan	11/10/01	27/05/02	15/07/02	Fiente de poule + compost végétal	2	Herse étrille	Rien	
	AII	Maïs	Féverole		Renan	12/10/01	27/05/02	15/07/02					
	AIII	Maïs	Féverole		Aristos	16/10/01	03/06/02	15/07/02					
	BI	Prairie	Maïs	oui	Apache	27/11/01	30/05/02	22/07/03	Rien	3	Herse étrille		
	BII	Blé tendre	Féverole	non	Aristos	05/10/01	30/05/02	17/07/02					
	BIII	Prairie	Prairie	oui	Aristos	17/10/01	30/05/02	17/07/02					
	BIV	Luzerne	Luzerne	oui	Aristos	31/10/01	03/06/02	22/07/03	Granules	2	Herse étrille		
	CI	Pomme de terre	Haricots verts		Aristos	27/10/01	31/05/02	22/07/03					
	CII	Trèfle	Pomme de terre		Aristos	27/10/01	31/05/02	22/07/03					
	CIII	Légumes	Haricot vert	oui	Aristos	27/10/01	31/05/02	22/07/03	MO+Méthabole+Kiesérite	3	Herse étrille		
	CIV	Pomme de terre	Maïs		Aristos	10/11/01	03/06/02	29/07/02					
	DI	Tournesol	Trèfle violet		Apache	17/10/01	27/05/02	12/07/02					
	DII	Seigle	Trèfle violet	oui	Renan	17/10/01	22/05/02	12/07/02	Méthabole+ Kiesérite	1	Herse étrille		Soufre
	DIII	Luzerne	Basilic Persil		Apache	17/10/01	27/05/02	12/07/02					
DIV	Trèfle	Triticale	Apache		15/12/01	03/06/02	12/07/02						
EI	Blé tendre	Maïs*	oui	Isengrain	05/11/01	03/06/02	15/07/02	Fiente de poule + Vinasse de betteraves	3	Houe rotative	Rien		
EII	Tournesol*	Trèfle violet		Apache	25/10/01	24/05/02	13/07/02						
2002-03	AIV	Blé tendre	Féverole	oui	Renan	21/10/02	03/06/03	15/07/03	Fiente de poule + déchets verts	1	Herse étrille	Rien	
	BV	Blé tendre	Maïs	oui	Apache	27/11/02	03/06/03	15/07/03	Rien	0			
	BVI	Blé tendre	Maïs	non	Apache	26/11/02	03/06/03	15/07/03	Compost fumier bovins	1	Houe rotative Herse-étrille		
	BVII	Blé tendre	Féverole	oui	Renan	23/10/02	03/06/03	15/07/03					
	BVIII	Prairie	Prairie		Renan	28/10/02	03/06/03	15/07/03					
	CV	Trèfle	Trèfle violet *	oui	Aristos	06/11/02	03/06/03	22/07/03	Granules	2	Herse étrille		
	CVI	Triticale	Haricot vert Pois*		Aristos	06/11/02	30/05/03	15/07/03					
	DV	Triticale	Trèfle violet	oui	Renan	20/10/02	27/05/03	07/07/03	MO+ Kiesérite	1	Houe rotative Herse-étrille		
	DVI	Triticale	Trèfle / Ray-grass		Apache	20/11/02	27/05/03	07/07/03					
	EIII	Tournesol	Trèfle violet		Apache	23/10/02	27/05/03	07/07/03					
	EIV	Tournesol	Trèfle violet	oui	Renan	23/10/02	27/05/03	07/07/03	Fiente de poule + Vinasse de betteraves	2	Houe rotative Herse-étrille		Sulfate de potasse et dioxyde de soufre
	EV	Tournesol	Trèfle violet		Renan	17/10/02	27/05/03	07/07/03					
EVI	Tournesol	Trèfle violet	Renan		17/10/02	27/05/03	07/07/03						

Toutes les parcelles commençant par la même lettre sont cultivées par un même agriculteur. \*, culture en 2<sup>ème</sup> année de conversion. MO, Matières Organiques ; Méthabole, association de minéraux ; Kiesérite, sulfate hydraté de magnésium (MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O), essentiel à l'assimilation chlorophyllienne et servant aussi à la formation des composés phosphatés, glucides, protides et vitamines.

le réseau la première année (2001-02) sont suivies lors de la deuxième campagne : *Renan*, *Apache*, *Aristos*. Il y a moins d'*Apache* et d'*Aristos* en 2002-03 que l'année précédente car ces deux variétés ont présenté de trop faibles teneurs en protéines à la récolte 2001-02, ce qui a dissuadé les agriculteurs de les cultiver à nouveau l'année suivante.

## 1.2- Expérimentation analytique

Ce type de dispositif a pour but de mieux comprendre un phénomène peu ou mal connu dans la littérature, grâce à l'analyse d'un petit nombre de facteurs seulement. Dans la bibliographie, très peu d'éléments traitent des voies de dissémination des champignons en champ, alors qu'il s'agit évidemment d'un élément important. Ce phénomène, *a priori*, dépend des obstacles à la dispersion des spores créés par le peuplement végétal, mais aussi du microclimat du couvert, qui influence à la fois la conservation des champignons, la production d'inoculum et la maturation des champignons, ainsi que de la conservation des résidus de la culture précédente qui sont le support de la survie des champignons). Le microclimat du couvert dépend du climat général, mais aussi du travail du sol, de la densité des résidus et de celle du couvert (aussi bien culture qu'adventices). De plus, outre l'influence des adventices sur le microclimat et sur la dissémination aérienne des spores, la nature particulière des adventices (hôte ou non du pathogène) intervient également probablement dans la production d'inoculum. **Essayer de comprendre les effets de différentes densités de couvert, densités de semis et densités d'adventices** (sur le microclimat, en tant qu'obstacles à la dissémination, en tant qu'hôtes pour la production de spores, ou encore dans le cadre d'une compétition pour les éléments minéraux) a donc constitué la raison de nos "expérimentations analytiques".

En 2001-02, deux expérimentations ont ainsi été mises en place sur les parcelles BI et EI, où trois densités de semis, avec ou sans désherbage, ont été cultivées dans trois blocs. Le temps passé à l'étude des adventices (identification et pesée) et le peu de résultats positifs obtenus (le désherbage n'a pas eu d'effet sur la densité d'adventices au champ, nous empêchant de voir un effet de la densité sur les symptômes de fusariose et/ou la contamination en mycotoxines), nous n'avons pas reconduit cette étude en 2002-03. L'absence d'effet du désherbage sur les essais de 2001-02 peut probablement s'expliquer par la très forte hétérogénéité d'infestation en adventices de la parcelle, et par les types d'adventices rencontrés, essentiellement du trèfle (qui ne gêne pas l'agriculteur) et du chardon (qui aurait nécessité un binage manuel qui n'a pas eu lieu).

Au cours de la seconde année d'étude (2002-2003), une expérimentation a comparé trois densités de semis sur la parcelle BV. L'étude a été, de plus, complétée par deux densités différentes générées (en effectuant la coupe d'un épi sur deux) à la floraison dans la parcelle du bloc I de "l'essai systèmes", cultivée selon un système de culture biologique avec la variété *Apache*. Dans chaque essai, nous avons observé un important manque à la levée et un faible tallage, dû à un printemps froid et sec et aux carences azotées résultant de l'implantation des essais sur des parcelles précédemment cultivées avec du maïs (ce choix avait été fait pour tenter de maximiser les attaques de fusariose) : ceci n'a pas permis d'obtenir de fortes densités d'épis (100 à 450 épis/m<sup>2</sup> selon les traitements et les blocs, densités inférieures à celles des parcelles suivies sur le réseau). Par ailleurs, la visite de sangliers dans deux essais (parcelles BI et BV) qui ont donc été piétinés (et probablement mangés en partie) a accru la difficulté à exploiter ces essais. Vu les difficultés rencontrées, ces expérimentations analytiques n'ont donc finalement pas été exploitées de la façon prévue au départ, et les parcelles d'essai semées avec la densité moyenne de semis ont été finalement utilisées exactement comme des parcelles du réseau. Le réseau de parcelles suivies se compose donc de 17 parcelles en 2001-2002 et 13 parcelles en 2002-2003.

**Tableau 3-2 : Plan de “l’essai systèmes” de longue durée à Versailles : exemple de la répartition des parcelles en 2001-02**

Bloc II	Système Biologique	Blé 0,5 ha	<i>Renan</i> <i>Apache</i> <i>Charger sans fongicide</i>	<i>Charger sans fongicide</i> <i>Charger</i>	Pois 0,5 ha	Système Conventionnel
		Luzerne 0,5 ha			Blé 0,5 ha	
Bloc II	Système Sans travail du sol avec couverture permanente	Blé 0,5 ha	<i>Charger sans fongicide</i> <i>Mélange</i>	<i>Apache</i> <i>Mélange</i> <i>Charger sans fongicide</i>	Pois 0,5 ha	Système Intégré
		Pois 0,5 ha			Blé 0,5 ha	
Bloc I	Système Conventionnel	Blé 0,5 ha	<i>Charger sans fongicide</i> <i>Charger</i>	<i>Charger sans fongicide</i> <i>Apache</i> <i>Renan</i>	Blé 0,5 ha	Système Biologique
		Pois 0,5 ha			Luzerne 0,5 ha	
Bloc I	Système Intégré	Blé 0,5 ha	<i>Charger sans fongicide</i> <i>Mélange</i> <i>Apache</i>	<i>Charger sans fongicide</i> <i>Mélange</i>	Pois 0,5 ha	Système Sans travail du sol avec couverture permanente
		Pois 0,5 ha			Blé 0,5 ha	

Les différentes variétés de blé étudiées sont renseignées sur ce tableau. *Mélange* correspond à un mélange des variétés *Somme*, *Malacca*, *Apache* et *Virtuose* (25% de chacune d’entre elles). Les parcelles mesurent 78 m de long ; les variétés sont cultivées par bandes de 12 m de large au minimum.

### 1.3- Essai systèmes de longue durée (Versailles)

Ce dernier dispositif, créé en 1997 pour **comparer dans un environnement commun quatre types de systèmes** : conventionnel (productif), intégré, avec travail du sol minimum et couverture permanente, et enfin biologique (**Tableau 3-2**), a été utilisé dans la présente thèse pour élargir la gamme des systèmes étudiés. Le comportement de ces quatre systèmes de cultures vis-à-vis des attaques de fusariose et de la production de mycotoxines fusariennes a été suivi depuis l'année 1999-00. De telles expérimentations de longue durée (durée prévue 10 ans minimum) sont assez rarement décrites dans la littérature.

Les quatre modes de conduite du blé suivis ont chacun leur cohérence propre, et sont comparés de façon globale (conduite dite "cohérente"), c'est-à-dire sans faire le détail des nombreuses différences dans les pratiques culturales : différences dans la fertilisation azotée, le travail du sol, la protection phytosanitaire, les dates de semis, les variétés, l'histoire culturale. Au sein de chaque système de culture, des sous-traitements expérimentaux sont éventuellement présents, permettant une évaluation plus détaillée des pratiques culturales. Ainsi, une culture de blé de la variété *Charger*, cultivée sans fongicide, est présente sur chaque système (conduite dite "contrôle"). De plus, le système de culture biologique présente une culture avec une variété, *Renan*, très présente chez les agriculteurs. Enfin, en 2001-02, le système intégré a également été cultivé avec la variété *Apache*. Nous disposons ainsi, sur les deux années 2001-02 et 2002-2003, de 10 et 9 systèmes respectivement répétés dans 2 blocs où les quatre systèmes de culture principaux sont répartis aléatoirement. Les itinéraires techniques de chaque système au cours des quatre années dont nous utilisons les résultats sont présentés dans le **Tableau 3-3**.

## 2- Protocoles expérimentaux

Beaucoup des mesures effectuées sont très classiques, nous ne détaillerons que celles qui ne le sont pas.

### 2.1- Caractérisation du milieu

Le milieu cultivé de chaque parcelle a été caractérisé par deux catégories de mesures :

- un suivi climatique quotidien des parcelles (rayonnement global, pluviométrie, température - minimale, moyenne et maximale- et humidité relative de l'air -minimale, moyenne et maximale-). Ce suivi est réalisé grâce aux relevés de Météo France pour les parcelles situées à moins de 20 km d'une station météorologique de Météo France et qu'aucune barrière naturelle -forêt, fleuve, colline ou vallon- ne sépare de la station ; pour les parcelles des exploitations A et B, une station météorologique supplémentaire a été installée directement dans l'exploitation, à cause de la présence d'obstacles naturels (vallon, bois) entre les parcelles et la station de Météo France la plus proche ;
- des analyses chimiques (azote minéral et organique, phosphore, potassium, magnésium et silicium), physiques (structure, texture) et la mesure de la teneur en matières organiques des sols. Pour toutes les parcelles, les analyses chimiques, de texture et de teneur en matière organique sont faites après un carottage réalisé à la sortie de l'hiver. Les résultats de ces analyses sont présentés dans l'**Annexe 2**. La structure du sol est déterminée en mai-juin (après la mise en place des racines) par l'intermédiaire d'un profil cultural de la couche labourée (0-30 cm), sur une largeur de semoir (3 ou 4 m) ; en 2001-02, cette analyse a été réalisée sur toutes les parcelles agricoles, et en 2002-03 elle a été réalisée sur celles de l'essai longue durée.

**Tableau 3-3 : Principales caractéristiques des parcelles de “l’essai systèmes” de longue durée à Versailles**

a- Années 1999-00 et 2000-01

Année	Systèmes de culture <sup>a</sup>	Précédent <sup>b</sup>	Travail du sol <sup>c</sup>	Variétés <sup>d</sup>	Date de semis	Date de floraison	Date de récolte machine	Azote (kg/ha)	Nombre de désherbages	Outil de désherbage	Matières actives fongicides
1999-00	Productif sans fong.	Colza	labour	<i>Charger</i>	11/1099	23/05/00	03/08/00	247	1	Herbicide	Rien
	Productif avec fong.	Colza		<i>Charger</i>							Azoxystrobinurines <sup>e</sup>
	Intégré	Colza	superficiel	<i>Charger</i> <i>SMRCr</i>	27/10/99	25/05/00		197	2-3	Herbicide	Rien
	Sans travail du sol	Maïs	non	<i>Charger</i> <i>SMRCr</i>					1	Herbicide	Rien
	Biologique	Colza	superficiel	<i>SMRCr</i> <i>Charger</i>	10/11/99	30/05/00		0	3	Herse étrille	Rien
2000-01	Productif sans fong.	Colza		<i>Charger</i>							Rien
	Productif avec fong.	Colza	labour	<i>Charger</i>	04/10/00	28/05/01		249	3	Herbicide	Cyprodinil / Epoxiconazole / Azoxystrobinurines / Prochloraze / Tebuconazole <sup>f</sup>
	Intégré	Colza	superficiel	<i>Charger</i> <i>SMRCr</i>	24/10/00	01/06/01	30/07/01	201	2	Herbicide	Rien
	Sans travail du sol	Pois	non	<i>SMRCr</i>	25/10/00	01/06/01		167	1	Herbicide	Cyprodinil / Azoxystrobinurines <sup>g</sup>
	Biologique	Lupin	superficiel	<i>CVRP</i>	17/10/01	27/06/01		0	1 3	Herse rotative Herse étrille	Rien

<sup>a</sup> Productif avec ou sans fongicide (fong.), Sans travail du sol avec couverture permanente (Sans travail du sol), Intégré ou Biologique. <sup>b</sup> La culture antérieure est toujours un blé tendre. <sup>c</sup> En système intégré, il y a un labour tous les deux ans mais jamais avant la culture de blé : le labour est toujours fait après la culture de blé. En système productif, il y a un labour tous les 4 ans dans chaque sous-bloc, mais pas globalement par bloc (**Figure 3-2**). <sup>d</sup> *SMRCr*, mélange (25% de chaque) des variétés : *Somme, Malacca, Renan, Camp Remy* ; *CVRP*, mélange (25% de chaque) des variétés : *Charger, Virtuose, Renan, Painsdor*. <sup>e</sup> 0,5 l/ha d’amistar le 24 mai ; <sup>f</sup> 0,8 kg/ha d’unix plus 0,5 l/ha d’opus le 12 avril, et 0,55 l/ha d’amistar plus 0,6 l/ha d’épopée le 18 mai ; <sup>g</sup> 0,8 kg/ha d’unix le 26 avril et 0,5 l/ha d’amistar le 28 mai

b- Années 2001-02 et 2002-03

Année	Systèmes de culture <sup>a</sup>	Précédent <sup>b</sup>	Travail du sol <sup>c</sup>	Variétés <sup>d</sup>	Date de semis	Date de floraison	Date de récolte manuelle	Date de récolte machine	Azote (kg/ha)	Nombre de désherbage	Outil de désherbage	Matières actives fongicides	
2001-02	Productif sans fong.	Pois	superficiel	<i>Charger</i>	05/10/01	06/06/02	17/07/02	29/07/02	208	1	Herbicide	rien	
	Productif avec fong.	Pois		<i>Charger</i>			22/07/02					Azoxystrobinurines / Epoxiconazole <sup>e</sup>	
	Intégré	Pois	superficiel	<i>Charger</i>	17/10/01	06/06/02	17/07/02	29/07/02	131	2	Herbicide	rien	
				<i>Apache</i>		22/05/02	17/07/02	30/07/02				Azoxystrobinurines / Epoxiconazole <sup>f</sup>	
				<i>SMAV</i>		06/06/02	22/07/02						
Sans travail du sol	Pois	non	<i>Charger</i>	26/10/01	06/06/02	17/07/02	29/07/02	141	2	Herbicide	rien		
			<i>SMAV</i>		25/05/02	22/07/02	30/07/02				Azoxystrobinurines / Epoxiconazole <sup>f</sup>		
2002-03	Biologique	Pois	labour	<i>Apache</i>	31/10/01	22/05/02	11/07/02	30/07/02	54	3-4	Herse étrille	rien	
				<i>Charger</i>		06/06/02	22/07/02	29/07/02					
				<i>Renan</i>				30/07/02					
	Productif sans fong.	Pois		<i>Charger</i>								rien	
	Productif avec fong.	Pois	superficiel	<i>Charger</i>	01/10/02	02/06/03	09/07/03	15/07/03	188	3	Herbicide	Cyprodinil / Fenpropimorphe / Epoxiconazole / Azoxystrobinurines / Prochloraze / Tebuconazole <sup>g</sup>	
Intégré	Pois	superficiel	<i>Charger</i>	29/10/02	02/06/03	09/07/03	15/07/03	60	2	1	Herbicide	rien	
			<i>VMAC</i>										
Sans travail du sol	Pois	non	<i>Charger</i>	08/10/02	02/06/03	09/07/03	15/07/03	56	2	Herbicide	rien		
			<i>VMAC</i>										
Biologique	Pois	labour	<i>Apache</i>	06/11/02	02/06/03	09/07/03	15/07/03	0	1	1	Herse étrille	rien	
			<i>Charger</i>										
			<i>Renan</i>										

<sup>a</sup> Productif avec ou sans fongicide (fong.), Sans travail du sol avec couverture permanente (Sans travail du sol), Intégré ou Biologique. <sup>b</sup> La culture antérieure est toujours un blé tendre. <sup>c</sup> En système intégré, il y a un labour tous les deux ans mais jamais avant la culture de blé : le labour est toujours fait après la culture de blé. En système productif, il y a un labour tous les 4 ans dans chaque sous-bloc, mais pas globalement par bloc (**Figure 3-2**). <sup>d</sup> SMAV, mélange (25% de chaque) des variétés : *Somme, Malacca, Apache, Virtuose* ; VMAC, mélange (25% de chaque) des variétés : *Virtuose, Malacca, Apache, Charger*. <sup>e</sup> 1 l/ha d'amistar le 15 mai et 0,5 l/ha d'amistar plus 0,7 l/ha d'opus le 30 mai, <sup>f</sup> 0,5 l/ha d'amistar plus 0,7 l/ha d'opus le 30 mai ; <sup>g</sup> 0,75 kg/ha d'unix plus 0,3 kg/ha d'opus team le 9 avril, 1 l/ha d'amistar le 15 mai, et 0,7 l/ha d'épopée le 30 mai.

**Tableau 3-4 : Stades de développement des céréales et phases de formation des composantes du rendement au cours du cycle de développement du blé**

Stade	Echelle de Feekes	Caractéristiques	Phases de formation des composantes du rendement
Semis		- Grain	↑ Nombre de plantes / m <sup>2</sup>
Levée	1	- 1 <sup>ère</sup> feuille traverse le coléoptile, - 3 feuilles étalées	
Début tallage	2	- 1 <sup>ère</sup> talle, 4 <sup>ème</sup> feuille	↓ Nombre d'épis / m <sup>2</sup>
Plein tallage	3	- 3-4 talles	
Epi 1 cm	5	- Sommet de l'épi à 1 cm du plateau de tallage	↑ Nombre de grains / épi
Montaison	6-7	- 1-2 nœuds, - Elongation de la tige	
Méiose pollinique (mâle) Gonflement	8 9	- Apparition de la dernière feuille, - Ligule juste visible - Epi gonfle la gaine de la dernière feuille,	
Epiaison	10-3	- Gaine éclate, - Epi sort	↓ Nombre de grains / m <sup>2</sup>
Floraison	10-5-2	- Fleurs	
Grains laiteux, pâteux Maturité physiologique		- Grains formés, laiteux, pâteux, jaunes, mûrs	

↑  
Poids de 1000 grains

Un stade donné est déclaré atteint sur la parcelle lorsque 50 % des plantes de la parcelle l'ont atteint. Les stades sont numérotés d'après l'échelle de Feekes, 1941.

### Encadré 3-2 : Définition de l'indice de nutrition azotée

Jusqu'à la floraison, l'indice de nutrition azotée (INN), défini pour refléter l'état nutritionnel du couvert vis-à-vis de l'azote, est le rapport de la quantité d'azote présente dans la plante à une quantité "critique" d'azote, réputée optimale pour la plante. Cette quantité critique est celle pour laquelle le taux de croissance de la plante est maximum (Ulrich, 1952) :

$$\text{INN} = \text{Azote} / \text{Azote critique}$$

Pour le blé, cette valeur critique a pour expression (Justes *et al.*, 1994) :

$$\% \text{ Azote critique} = 5,35 \times \text{Matière sèche}^{-0,442}$$

(Matière sèche en t/ha)

Quand l'indice de nutrition azotée est inférieur à 0,9, le couvert est en carence ; quand il est compris entre 0,9 et 1,1 le couvert est à l'optimum de nutrition.

Cet indice a été défini à partir de systèmes de culture conventionnels. Mais tout comme David (2004), nous considérons qu'*a priori* les besoins en azote n'ont pas de raison d'être différents dans les cultures bio et non bio, et nous utiliserons donc le même indice pour caractériser l'état nutritionnel des parcelles bio.

## 2.2- Caractérisation du peuplement

Deux types de peuplement ont été caractérisés : les résidus des cultures précédentes et le couvert de l'année (qui comprend la culture elle-même ainsi que les adventices).

### 2.2.1- Caractérisation des résidus

L'hypothèse principale formulée pour expliquer qu'un précédent cultural de maïs soit généralement associé à de forts niveaux d'attaque de fusariose et de production de toxines est qu'une culture de maïs laisse derrière elle davantage de résidus que d'autres cultures, résidus susceptibles de servir de réservoir de champignons pathogènes pour la saison suivante (Teich and Hamilton, 1985 ; McMullen *et al.*, 1997 ; Dill-Macky and Jones, 2000). Au-delà du cas particulier du maïs, le couple (nature/densité) des résidus de la culture précédente pourrait bien déterminer l'inoculum du champ pour la saison suivante. Nous avons donc quantifié les résidus de surface (sur une échelle allant de 1 à 6), après évaluation à l'œil du nombre de résidus présents sur une surface de 0,5 m<sup>2</sup> (1, 0-1 résidus ; 2, 2-10 résidus ; 3, 11-30 résidus ; 4, 31-60 résidus ; 5, 61-100 résidus ; 6, plus de 100 résidus). Pour chaque parcelle de l'essai de longue durée, cette évaluation a été répétée sur 3 placettes de 0,5 m<sup>2</sup> par bloc et pour chaque traitement ; pour les parcelles d'agriculteurs, cette évaluation a été répétée sur 9 de ces placettes de 0,5 m<sup>2</sup>. Les évaluations ont été faites entre la sortie de l'hiver et le stade "épi 1cm" du blé.

### 2.2.2- Caractérisation du peuplement végétal

Pour caractériser le peuplement du couvert, des prélèvements sont réalisés sur 9 placettes de 2 rangs de 0,5 m linéaire en 2001-02 et sur 6 placettes de 2 rangs de 1 m linéaire en 2002-03, à l'intérieur des parcelles agricoles et des parcelles de l'essai systèmes. La variabilité inter-placettes est plus réduite si on prélève 1 m plutôt que 0,5 m de longueur, et c'est pour prélever toujours approximativement le même volume de végétaux que nous avons réduit le nombre de placettes. Les prélèvements sont réalisés à différents stades physiologiques du blé. Ces stades sont présentés dans le **Tableau 3-4**.

Le **couvert d'adventices** est évalué selon la méthode de Dalbiès-Dulout (1999) : on repère les espèces d'adventices présentes, leurs hauteurs par rapport à la culture, et leur densité (estimée d'une part en pesant la matière sèche totale d'adventices après un étuvage de 48 h à 80°C, d'autre part en évaluant le pourcentage de recouvrement de la placette). Ces notations sont réalisées tous les quinze jours tout au long de la culture.

La **culture** elle-même est caractérisée par sa hauteur tout au long de la phase de remplissage des grains, et par sa densité (nombre d'épis et matière sèche par m<sup>2</sup>). Sur toutes les parcelles, la teneur en azote (et pour certaines dates l'indice de nutrition azotée, cf **Encadré 3-2**) des pailles et des épis est évaluée à quatre reprises : au stade "épi 1 cm", à la floraison, pendant la phase de remplissage des grains, et à la récolte. En 2002-03, nous avons également déterminé la teneur en phosphore, potassium, magnésium et glucides (glucose, fructose et saccharose) des grains, notamment pour tester une éventuelle influence de l'environnement nutritif du champignon sur la production de toxines. A la récolte, les composantes classiques du rendement (rendement, nombre de grains par m<sup>2</sup>, poids de mille grains) et le taux de protéines dans les grains sont mesurés. Sur l'essai de longue durée, une récolte mécanique est réalisée, en plus de la récolte manuelle effectuée comme sur les autres parcelles.

Une attention particulière a été portée à l'**état sanitaire de la culture**. Ainsi, les maladies présentes ont été notées tous les quinze jours depuis le stade "épi 1 cm" jusqu'à deux à trois semaines environ avant la récolte, après observation de 30 plantes prélevées sur 9 placettes par parcelle. Pour les tiges et bas de tiges, on note la fréquence de chaque maladie (pourcentage des tiges ou bas de tiges infectés). Pour les feuilles, on caractérise toutes les maladies présentes (ainsi que la sénescence), en notant pour les 3 dernières feuilles le pourcentage de la surface foliaire atteinte.

**Tableau 3-5 : Notation de la fusariose dans la littérature**

Poids de mille grains (PMG) ou Rendement (Rdt) (Mesterhazy, 1977)	PMG mieux que Rdt ou nombre de grains / épi (Dormann et Oettler, 1990)
<b>Nécessite d'une forte attaque !!</b>	Faux, car perte des petits grains (Martin et Johnston, 1982 )
% d'épis attequés	Nombre de grains attequés dépend du type 1 de résistance de la plante (Wilcoxson <i>et al.</i> , 1992)
Surface des épis infectés	Mesterhazy, 1977; Dill-Macky et Jones, 2000 (sur 90 épis); Bai <i>et al.</i> , 2001
% de grains attequés Schroeder et Christensen, 1963 ; Bai <i>et al.</i> , 2001	Wilcoxson <i>et al.</i> , 1992 ; Dill-Macky et Jones, 2000 (sur 90 épis);
% d'épillets attequés	Mesterhazy, 1995 (note de 1 à 4)
Type de résistance	Wang <i>et al.</i> , 1982 cité par Bai <i>et al.</i> , 2001 ; Liu, 1997; Langseth, 1997; Skinnes, 1997; Elen, 1997; Sundheim, 1997

**Figure 3-2 : Symptômes de fusariose**

a- Type "échaudage"



b- Type "cerne noir"



**Sur les épis**, seule la fusariose a été recherchée. Elle a été caractérisée en notant le pourcentage d'épillets attaqués et la surface d'enveloppes attaquée de ces épis : la note 1 correspond à une surface d'enveloppes touchée inférieure à moins d'un tiers de la surface totale d'enveloppes, la note 2 à une surface d'enveloppes touchée comprise entre un tiers et deux tiers de la surface totale d'enveloppes, et la note 3 à une surface d'enveloppes touchée de plus des deux tiers de la surface totale d'enveloppes. La notation a été réalisée sur 100 épis prélevés au hasard en 2001-02 et de 30 à 50 épis en 2002-03. Il existe deux types de symptômes de fusariose (**Figure 3-2**) : des cernes ovales noirs et une couleur blanchâtre des épis (du type d'un échaudage précoce) qui s'accompagne parfois de moisissures blanches ou roses. Ces deux types de symptômes correspondent en général à des espèces différentes de champignons pathogènes (Parry *et al.*, 1995), mais il semble que la plupart des espèces soient néanmoins capables de produire l'un et l'autre type de symptômes (Parry *et al.*, 1995) : aussi, nous ne les avons pas distingués. On peut par ailleurs noter que les symptômes de moisissures ont été très rares sur nos parcelles (tout au plus quelques épis par parcelle).

### 2.2.3- Caractérisation de la contamination des grains

Après la récolte (manuelle dans les parcelles agricoles et manuelle ou mécanique dans l'essai systèmes), les **mycotoxines fusariennes** sont dosées sur les grains. Suite à la récolte manuelle, les épis sont d'abord séchés (48h à 80°C), puis battus. En 2001-02, après cette seule séparation mécanique des grains de leurs enveloppes, 300g de grains étaient échantillonnés pour envoi au laboratoire d'analyse ; en 2002-03, on a échantillonné une quantité plus importante de grains (1 à 1,2 kg, provenant de 10 bottillons de 20 épis), et on a réalisé un tri plus fin (mécanique puis manuel), puis les grains ont été broyés pour finalement envoyer 300 g de farine au laboratoire d'analyse. On reviendra sur ces deux protocoles dans le chapitre 4. Lors des récoltes mécaniques dans l'essai systèmes, dix petits échantillons de grains (environ 100g chacun) ont été récupérés sous la trémie de la moissonneuse et mélangés. La même procédure que dans les autres parcelles, selon l'année, a été ensuite utilisée pour constituer l'échantillon finalement envoyé au laboratoire d'analyse.

D'autres dosages ont été réalisés en cours de remplissage des grains, qui seront décrits plus spécifiquement au chapitre 4.

## 2.3- Méthodes employées

Afin d'éviter des répétitions dues à la présentation d'une partie des résultats sous forme d'articles publiés dans les chapitres suivants, seules les méthodes communes à l'ensemble des chapitres de résultats sont décrites ici ; quand des méthodes ne sont utilisées que dans un seul chapitre de résultats (**Chapitre 4, 5 ou 6**), elles y seront alors décrites.

### 2.3.1- Détermination du niveau d'attaque par la fusariose

L'attaque de fusariose de l'épi est caractérisée par deux composantes : la "gravité" et l'"intensité" d'attaque, suite à la lecture de la littérature (**Tableau 3-5**). La **gravité d'attaque** ("disease severity" dans les articles) correspond au pourcentage moyen d'épillets par épi présentant plus d'un tiers de leur surface atteinte par des symptômes de fusariose. En effet, nous n'avons pas considéré les épis attaqués de note 1 (sur moins d'un tiers de leur surface), de peur d'une confusion entre les symptômes de la fusariose et ceux de la septoriose sur épi, et pour limiter un éventuel effet "notateur" : différentes personnes ont ainsi pu participer à la notation des épis, sans que cela influence trop la note obtenue. L'**intensité d'attaque** correspond à la moyenne du pourcentage d'épis présentant au moins un épillet dont les enveloppes sont couvertes sur plus d'un tiers de leur surface par des symptômes de fusariose.

### 2.3.2- Méthodes d'analyse de la production de toxines

Il existe plusieurs méthodes de détection des toxines. Les méthodes physico-chimiques (**Encadré 3-3**) sont généralement basées sur la chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou la

### **Encadré 3-3 : Principes des dosages physico-chimiques des trichothécènes**

La **chromatographie d'affinité** est une technique analytique qui repose sur la partition d'un composé entre le solvant dans lequel il est initialement dissout (et que l'on appellera la phase mobile) et une phase solide (que l'on appellera la phase stationnaire) emprisonnée dans la colonne parcourue par le solvant. En tous les points de la colonne, une certaine fraction de la concentration locale totale du composé va rester fixée sur la phase stationnaire, et ce composé va donc "ressortir" de la colonne plus tard que s'il n'avait aucune affinité pour cette phase stationnaire. Les différents composés peuvent donc être séparés les uns des autres, en fonction de leur affinité pour la phase solide.

**Chromatographie liquide haute performance (HPLC)** : Le solvant est liquide. Pour assurer une bonne résolution, la phase solide a une granulométrie très fine (est présente sous forme de très petites billes) et il faut donc "pousser" le solvant sous haute pression pour assurer des débits décents dans la colonne.

**Chromatographie en phase gazeuse (GC)** : La molécule à doser est vaporisée dans un solvant gazeux, puis injectée dans la colonne balayée par le même gaz "vecteur" (hélium, azote, argon ou hydrogène).

Différents types de détecteurs (souvent de simples détecteurs de la lumière transmise par l'échantillon) permettent de repérer la sortie des différents pics. Un **spectromètre de masse (MS)** mesurera la masse moléculaire de ce composé de façon suffisamment précise pour permettre son identification.

chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Elles sont fiables et permettent d'identifier et de quantifier les diverses toxines, même présentes à des taux très bas (Le Boulc'h *et al.*, 2000b ; Rimbault *et al.*, 2002) : leur seul inconvénient est leur coût (Le Boulc'h *et al.*, 2000b ; Rimbault *et al.*, 2002). La détermination des niveaux de déoxynivalénol par la détermination d'un coefficient d'absorption dans l'infrarouge est également en cours d'élaboration (Pettersson and Aberg, 2003). Les tests immuno-enzymatiques (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Bakan, 1998 ; Le Boulc'h *et al.*, 2000b) sont peu coûteux, mais leur utilisation n'est pas toujours très fiable, des faux négatifs ou des faux positifs pouvant apparaître ; en outre, un test ELISA ne dose souvent qu'une seule mycotoxine (Rimbault *et al.*, 2002). L'inhibition de l'activité d'enzymes comme la  $\beta$ -galactosidase, visualisable par des méthodes colorimétriques, peut également servir d'indicateur de toxicité globale d'un échantillon, mais ne révélera jamais que la présence d'un ensemble de mycotoxines (Engler *et al.*, 1999). Enfin, des dosages du nivalénol réalisés en mesurant la toxicité d'un échantillon pour des cultures cellulaires animales sont également en cours d'élaboration (Tsuda *et al.*, 1998) : la dégradation de l'ADN cellulaire rendrait compte de la concentration en nivalénol.

Nous n'avons pas testé toutes ces méthodes de mesure, mais avons retenu pour l'analyse de nos échantillons un laboratoire d'analyse (Qualtech, 54) utilisant notamment la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse, méthode la plus répandue pour l'analyse des trichothécènes (Bakan, 1998) et réputée comme étant la seule permettant une identification précise de ces toxines (Vidal, 1990 ; Placinta *et al.*, 1999). Une double analyse a été réalisée sur chaque échantillon : dosage de la zéaralénone par HPLC d'une part, et dosage des différents trichothécènes par GC-MS d'autre part. Ainsi, 11 trichothécènes sont simultanément dosées : six de types A (diacétoxyscirpénol, monoacétoxyscirpénol, néosolaniol, HT2 toxine, T2 toxine, T2 triol) et cinq de type B (3-acétyldéoxynivalénol, 15-acétyldéoxynivalénol, déoxynivalénol, fusarénone X et nivalénol).

#### 2.4- Méthodes d'analyses statistiques

Différentes méthodes statistiques ont été employées pour ce travail, en utilisant le logiciel SAS®.

Quand nous avons cherché des corrélations entre deux variables (analyser l'effet de variables explicatives sur d'autres variables à expliquer), nous avons en général utilisé un modèle linéaire. En effet, n'ayant pas *a priori* sur les formes des relations étudiées, nous n'avons pas cherché de relations plus complexes que les relations linéaires. Sous le logiciel SAS, l'option pas à pas de la régression linéaire ("stepwise") a parfois été utilisée afin de sélectionner, dans un ensemble de variables possibles, celle(s), permettant l'obtention du meilleur "coefficient de détermination" ( $R^2$ ) avec un minimum de variables explicatives. Ce coefficient permet d'évaluer la proportion de la variabilité de la variable à modéliser expliquée par les variables explicatives sélectionnées ("la qualité de l'ajustement") ; ce coefficient varie entre 0 (corrélation inexistante) et 1 (la connaissance des valeurs des variables explicatives permet de prévoir intégralement les valeurs de la variable à modéliser).

Le modèle est testé sur la valeur de paramètres : la probabilité que la corrélation soit significative (significativement différente de 0) est par ailleurs donnée par  $\alpha$  (risque d'erreur de 1<sup>ère</sup> espèce) qui correspond à la probabilité de rejeter l'hypothèse nulle (il n'y a pas de corrélation entre les variables) alors qu'elle est vraie : plus ce paramètre est petit, plus la corrélation est significative (plus les variables sont explicatives). On note \*, \*\* ou \*\*\* selon que ce coefficient est plus petit que 0.1, 0.05 ou 0.01.

Quand on cherche à identifier et classer les niveaux d'un facteur (identifier plusieurs populations au sein d'un jeu de données d'une variable qualitative), la *méthode de Bonferroni* estime si les différences deux à deux sont significatives (pour un risque d'erreur  $\alpha$  donné) grâce au test de Student corrigé (k



étant le nombre de populations, il y a  $k(k-1)/2$  comparaisons deux à deux). La correction consiste à remplacer  $\alpha$  par  $\alpha' = \alpha / k(k-1)/2$ , de sorte que le risque global d'erreur sur le classement soit bien  $\alpha$ .

Des classifications ascendantes hiérarchiques sont réalisées à l'aide du logiciel Xlstat® pour tenter de hiérarchiser les effets de variables préalablement identifiées. Traditionnellement, ces classifications, représentées par des arbres, sont utilisées pour visualiser des distances phylogénétiques entre différents objets (séquences, protéines...). La longueur des branches séparant deux objets est alors proportionnelle au temps (en années, ou millions d'années) écoulé depuis le moment où les objets ont divergé. Dans un objectif de classement et essentiellement de visualisation des résultats, nous avons utilisé ces arbres (encore appelés dendrogrammes) comme une méthode de classement hiérarchique de plusieurs objets : la longueur des branches représente (en étant proportionnelle) la distance qui sépare deux objets selon ce mode de classement. Ces classifications sont faites selon la méthode de Ward, d'après l'évaluation de *distances euclidiennes*. Pour cela, on commence par coder les variables qualitatives (par exemple, celles qui caractérisent le système de culture ; l'ordre est suggéré par la littérature, le code le plus fort étant par convention associé au risque le plus grand). Ainsi, pour l'antéprécédent et le précédent cultural, nous avons codé 2 pour maïs, 1 pour autres céréales, et 0 pour autres cultures ; pour le travail du sol, nous avons codé 1 pour l'absence de labour et 0 pour la présence d'un labour. Le codage des variétés repose sur le codage CTPS pour la résistance à la fusariose (**Annexe 1**) ; afin qu'il évolue dans le même sens que les autres variables et soit donc le plus grand pour le plus grand risque, nous avons inversé ces codes par rapport à 0 : -3 pour la variété *Isengrain* (résistance CTPS 3/9) ; -5 pour les variétés *Apache* (résistance CTPS 5/9) et *Aristos* (réputée résistante) ; -6 pour la variété *Renan* (résistance CTPS 6/9). Les variables qualitatives ainsi codées comme celles qui sont quantitatives (par exemple celles caractérisant la pluviométrie, la température, les attaques de fusariose, etc.), sont ramenées à des variables "centrées-réduites" (pour éviter notamment des effets d'échelle qui induiraient un poids plus ou moins important des différentes variables dans les calculs) ; puis on regroupe les deux variables "les plus proches", c'est-à-dire présentant la plus petite *distance euclidienne* ; enfin les autres variables sont agrégées, toujours en cherchant à minimiser la distance entre chacune d'entre elles.

- *La distance euclidienne* : est la racine carrée de la somme des carrés des distances entre les observations, rapportées à un repère orthogonal pour chaque couple de variables. Elle vaut 0 pour deux lignes ou deux colonnes identiques, mais elle ne possède pas de borne supérieure.
- *L'indice de dissimilarité* (ou plus simplement *dissimilarité*) entre deux variables traduit le niveau d'agrégation de ces deux variables et est égal à la perte de variabilité inter-classe due à leur regroupement.

Dans les chapitres 5 et 6, aucune analyse statistique n'est réalisée pour les données en nombre insuffisant : seules des "tendances" sont décrites.

Par convention, nous appellerons

- niveaux d'attaque : la quantification des symptômes de fusariose de l'épi,
- niveaux de contamination : les teneurs en mycotoxines des grains,
- taux d'infection des grains par l'espèce  $i$  : le pourcentage de grains présentant une souche de l'espèce  $i$  de champignons du complexe fusarien (cf. **Chapitre 6**)

De manière générale, il a également été convenu qu'en cas de teneur en toxine inférieure à la limite de détection (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pour celles détectées dans nos échantillons) ou de quantification (60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), la valeur moitié de ces limites sera employée dans les analyses statistiques et les représentations graphiques (respectivement 15 et 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).



## **Chapitre 4 - Mesure des teneurs en mycotoxines : effets des procédures d'échantillonnage, et variabilité**

Comme évoqué précédemment dans le chapitre 2, nous avons entrepris, avant toute tentative de classification des parcelles en fonction de leurs niveaux de contamination, d'étudier la fiabilité des procédures d'échantillonnage. Notre objectif n'est pas d'établir une procédure standardisée, ce qui demanderait un investissement en temps (comparaison de méthodes, grand nombre d'échantillons, élimination de tout risque d'erreur parasite) incompatible avec nos objectifs de thèse : il est plutôt d'identifier, et à terme d'éliminer, les éventuelles erreurs inhérentes aux pratiques d'échantillonnage, et d'évaluer le niveau d'erreur associé aux pratiques que nous avons finalement retenues. Une partie des résultats de ce chapitre a fait l'objet d'un article, dans lequel les procédures d'échantillonnage que nous avons utilisées sont décrites en détail.

### **1- Variabilité des mesures due à la méthode d'échantillonnage et à la conservation**

La variabilité intrinsèque de la contamination en mycotoxines observée dans des échantillons de grains pris dans un lot donné est très importante (Whitaker and Wiser, 1969 ; GIPSA, 1999 ; Hart and Schabenberger, 1999 ; Codex Alimentarius Commission, 2001 ; Armitage, 2003) : dans le cas des aflatoxines, près de 90% de l'erreur associée à un dosage de ces toxines a pu être attribuée à la constitution de l'échantillon (GIPSA, 1999). L'article intitulé : "Effects of grain sampling procedures on *Fusarium* mycotoxins assays in wheat grains", accepté par le "*Journal of Agricultural and Food Chemistry*", présente les conclusions des investigations que nous avons menées quant à la variabilité des teneurs mycotoxines liée à la variabilité intrinsèque des échantillons de grain. Les effets de différents modes de conservation des grains sont également décrits.



## Effects of Grain Sampling Procedures on Fusarium Mycotoxin Assays in Wheat Grains

AGNES CHAMPEIL,\* JEAN-FRANCOIS FOURBET, AND THIERRY DORE

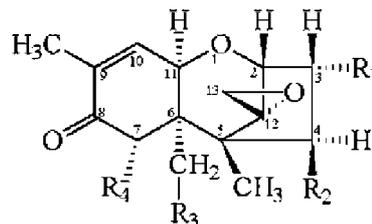
UMR d'Agronomie INRA/INA P-G, Centre INRA Versailles-Grignon,  
 78850 Thiverval-Grignon, France

*Fusarium* mycotoxins are increasingly studied agronomically, chemically, and pathologically in the context of food safety, as a means of preventing new major health crises. Reliable mycotoxin techniques and sampling procedures are required for assessment of the effects of different sources of variation on grain mycotoxin content in agronomic experiments. Analyses were performed with the aim of formulating guidelines for grain sampling to increase the reliability of grain mycotoxin measurement in agronomic experiments. Two toxins in wheat samples, deoxynivalenol and nivalenol, were targeted. With a nested linear mixed model, it was estimated that the uncertainty of nivalenol determination was low ( $\pm 15 \mu\text{g/kg}$ ), whereas that for deoxynivalenol determination was higher ( $\pm 38 \mu\text{g/kg}$ ). It was also found that grinding of the grain decreased the variability of the results. Moreover, despite the heterogeneity in grain mycotoxin content across a given field, it was shown that heads can be harvested manually for agronomic experiments provided that sampling is representative (evenly distributed over the entire plot area). Finally, delaying the assay until after harvest was found to affect the results obtained and should therefore be avoided.

**KEYWORDS:** Deoxynivalenol; nivalenol; sampling; sample preparation; sample conservation effect

### INTRODUCTION

Since the 1990s, several major health crises have shaken the food industry, and interest in food safety has increased. One of the key elements of the potential health risk associated with dietary cereals is the accumulation of mycotoxins in grains (1-3). Vomiting, reproductive disturbances, leukoencephalomalacia, pulmonary edema, impairment of the humoral and cellular immune responses, nervous disorders, myocardial hypertrophy, and several cancers may result from the ingestion of mycotoxins (4). Mycotoxins are fungal secondary metabolism products (2, 5) and result from the adaptation of fungal growth to stressful situations (6). The pathogenic fungal complex of the genus *Fusarium* is the principal producer of mycotoxins, notably of deoxynivalenol and nivalenol, in grains of growing crops (7). *Fusarium* and *Microdochium* also cause a cereal disease, *Fusarium* head blight (8-10). *Fusarium* mycotoxins are increasingly being studied in an attempt to prevent new major health crises. Agronomic experiments are carried out to assess the effects of different sources of variation on grain mycotoxin content (10-15). Reliable mycotoxin measurement techniques and appropriate sampling procedures are essential for such studies. Mycotoxin contamination is highly heterogeneous in cereal fields (16) and grain samples (17-21). Almost 90% of the error associated with aflatoxin testing can be attributed to the method used to obtain the original sample (21). Moreover, aflatoxin may be present at high concentrations in only <0.5% of the peanut crop, and concentrations may be as high as



Type B tricothecenes: DON (R1 = OH, R2 = H, R3 = OH, R4 = OH)  
 NIV (R1 = OH, R2 = OH, R3 = OH, R4 = OH)

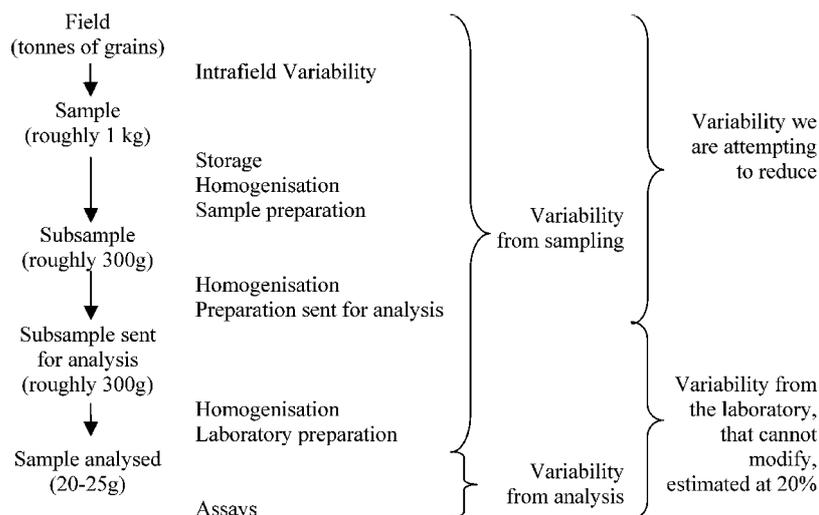
**Figure 1.** Chemical structures of type B tricothecenes.

1,000,000  $\mu\text{g/kg}$  in contaminated peanuts (17). We assessed the uncertainty of mycotoxin determination and the effect of mycotoxin sampling procedures on mycotoxin contamination levels for the *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol and nivalenol. The chemical structures of these toxins are presented in **Figure 1**. We aimed to characterize the errors occurring during each step of the procedure, from the field to the laboratory (**Figure 2**): sampling in the field (mechanical versus manual methods); sample preparation (flour or grain); and sample conservation.

### MATERIALS AND METHODS

**Experimental Design and Mycotoxin Analysis.** The samples used in this study came from a long-term experiment, the aim of which was to compare different cropping systems and assess the effects of several cropping systems on mycotoxin levels in winter wheat (12). Nine agronomic treatments were duplicated in this design, and two growing seasons were used (2001/2002 and 2002/2003). Thirty-six plots were

\* Corresponding author (telephone +33130815420; fax +33130815425; e-mail [champeil@grignon.inra.fr](mailto:champeil@grignon.inra.fr)).



**Figure 2.** Steps of the grain sampling procedures.

available for this methodological study, of which we used only 16. These plots were chosen according to the variability of head blight attacks. Plots A, B, H, and P were cropped under a conventional system, M was cropped under an integrated system, and I, N, and Q were cropped under an integrated direct drilling system, whereas plots C, D, O, F, J, K, L, and R were cropped under an organic system. We extended the range of systems and mycotoxin contents studied by also including two farmers' fields cropped under an organic direct drilling system in 2002/2003 (plots E and G): we therefore sampled a total of 18 plots.

Mycotoxin analyses were performed by the Qualtech laboratory (Vandoeuvre-les-Nancy, France). Levels of the trichothecenes nivalenol and deoxynivalenol were determined. Each sample (flour or grain) received by the laboratory was homogenized at least three times, in a mixer/divider. A small quantity of each sample was taken (20-25 g) and in the case of grain samples was ground. Trichothecenes were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). This method was validated by the French norm NF EN ISO/CEI 17025. The assay laboratory estimates the measurement error for trichothecenes at 20% (differences in extraction rate and errors in sample preparation in the laboratory assay are included).

In addition, according to laboratory assay data, the detection limit ( $d_i$ ) was 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for trichothecenes, and the quantification limit ( $q_i$ ) was twice the detection limit (60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). For the purpose of this study, mycotoxin contents below  $d_i$  or  $q_i$  were assigned values equal to half of these limits: 15 and 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively.

**Effect of Sample Preparation and Mycotoxin Measurement Uncertainty.** Twenty-four samples from the 18 plots were harvested mechanically (roughly 2 kg in total). They were dried at 80 °C for 48 h. Half of the 24 available samples (no. 1-12) were completely ground, and three flour subsamples of roughly 300 g each were used for mycotoxin analysis; this procedure for sample preparation before analysis was called "flour-flour" (flour subsamples taken from a sample already ground into flour). For each of the 12 remaining samples, three grain subsamples of roughly 300 g each were taken. The subsamples from samples 13-15 were completely ground and sent for mycotoxin analysis; we called this procedure "grain-flour" as the original sample was in the form of grain and converted to flour only after subsampling. The subsamples from samples 16-24 were not ground and sent directly for analysis (referred to as the "grain-grain" procedure, as both sample and subsample are in grain form). The mycotoxin content data obtained for these 24 samples were also used to evaluate the uncertainty of mycotoxin determination.

Mycotoxin analyses are destructive, making it impossible to carry out several measurements on the same sample. It is therefore difficult to characterize the repeatability and reproducibility of the assays rigorously because these two parameters must be determined for a single sample (22). However, we estimated the uncertainty of the assays by dividing each of the 24 samples into three subsamples. Measurement

uncertainty characterizes the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand (22-24) and may be estimated using a linear mixed model (25). We used the following model to describe our data:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + (A_i)_j + \varepsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  is the measured toxin content;  $\mu$  the general mean toxin content;  $\alpha_i$  a variable for the  $i$ th sample, which has a fixed effect;  $(A_i)_j$  a variable for the  $j$ th preparation, which has a random effect because the toxin content of the  $j$ th preparation depended on the toxin content of the sample  $A_i$ ; and  $\varepsilon_{ijk}$  the standard error, relating to  $k$ , the mycotoxin content of the subsample. The classic *proc glm* with the *random option* program of SAS software was used to calculate the intrapreparation method variance as the difference between the variance of  $(A_i)_j$  and the standard error. Measurement uncertainty was then calculated as half the confidence interval (CI) estimated using the equation

$$\text{measurement uncertainty} = \text{CI}/2 = [t_{(1-\alpha/2)(n-1)} \times \sqrt{(\text{variance } (A_i)_j - \text{variance } \varepsilon_{ijk})/n}]/2$$

where  $n$  is the number of subsamples.

We used all of the mycotoxin content data, regardless of the method of sample preparation, to estimate the mean square (population variance) from the variability of a given set of mycotoxin measures. We have therefore estimated mycotoxin measurement uncertainty according to the mixed model described above but with the  $(A_i)_j$  term eliminated. Thus,  $Y_{ij}$  was described by the following relationship:  $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$ . The preparation methods were not distinguished so  $j$  stands for the  $j$ th subsamples of the  $i$ th sample. In this model,  $\varepsilon_{ij}$ , which characterizes the modeling error, was associated with the maximum value of variability for the assay. The maximum measurement uncertainty can therefore be expressed as

$$\text{measurement uncertainty} = \text{CI}/2 = [t_{(1-\alpha/2)(n-1)} \times \sqrt{(\text{variance } \varepsilon_{ij})/n}]/2$$

This model is based on three assumptions. The first is equality of the variances for each level of variables. The other assumptions are normality and independence of the variables with random effect: kurtosis and skewness coefficients and the distribution of residues with respect to predicted values were also assessed.

The effects of preparation procedures on measurement variability were investigated for plots A-C and P-R for which two types of sample preparation were carried out. The  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + (A_i)_j + \varepsilon_{ijk}$  model was used to estimate (i) interpreparation variance, that is, the variance of  $(A_i)_j$  and (ii) intrapreparation variance, that is, the ratio between the difference between interpreparation variances [those of

**Table 1.** Mycotoxin Levels Determined for Three Subsamples per Sample, with Each Sample Corresponding to a Plot<sup>a</sup>

preparation when sampling	sample sent for analysis	sample	plot	deoxynivalenol, µg/kg			nivalenol, µg/kg		
				subsample 1	subsample 2	subsample 3	subsample 1	subsample 2	subsample
flour	flour	1	A	150	160	320	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		2	B	240	290	240	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		3	C	330	310	390	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		4	D	60	100	120	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		5	E	370	380		<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	
		6	F	110	90	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		7	G	200	190		<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	
		8	H	240	250	250	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>
		9	I	800	650	600	120	150	150
		10	J	110	100	130	60	60	80
		11	K	110	100		60	<d <sub>i</sub>	
		12	L	100		<d <sub>i</sub>	70	<d <sub>i</sub>	
grain	flour	13	P	190	160	100	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>
		14	Q	550	400	430	80	80	70
		15	R	110	90	120	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>
grain	grain	16	A	210	330	170	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>
		17	B	360	120	210	<d <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		18	C	350	500	360	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		19	M	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>
		20	N	500	700	600	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>
		21	O	350	340	340	<d <sub>i</sub>	60	<q <sub>i</sub>
		22	P	200	240	200	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>
		23	Q	550	340	550	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	60
		24	R	<d <sub>i</sub>	60	110	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>

<sup>a</sup> No result indicates that no analysis was carried out; <d<sub>i</sub> = mycotoxin not detected (<30 µg/kg); <q<sub>i</sub> = mycotoxin level lower than the quantification limit (<60 µg/kg).

(A<sub>ij</sub>) and the standard error (those of  $\epsilon_{ijk}$ ) and the number of subsample mycotoxin content values ( $k$ ). We investigated whether there was an interpreparation effect or an intrapreparation effect by means of a  $\chi^2$  test comparing these variances and the population variance. These effects were also estimated by calculating the variation coefficient for mycotoxin content (as the ratio of mean square and mean), and the standard deviation for each preparation.

**Effect of Harvest Procedure.** Three in-field sampling procedures were investigated (one mechanical and two manual harvest methods) and compared on three plots (P-R). Grain mycotoxin content was measured just after harvest. For mechanical harvesting, grain sampling was based on the 98/53/CE directive (26), which was subsequently modified by the 2002/27/CE directive (27), a document that lays down the sampling procedure for official control of aflatoxin level. This directive was used because there is no equivalent text dealing with *Fusarium* toxins. According to this directive, for plots with yields below 1 tonne, 10 samples of 100 g each must be collected and pooled to give a total sample of 1 kg. The samples (in our case roughly 2 kg) were then dried at 80 °C for 48 h. For the first method of manual harvest (the "hundred method"), we collected 10 randomly selected samples of 100 heads each from each experimental plot (at least 1 kg). For the second method (the "quadrat method") we collected the heads from nine quadrats made up of 1 m x 2 adjacent rows from each experimental plot (900 g-1 kg). The harvested heads were dried at 80 °C for 48 h, and the glumes and rachis were separated from the grains. Grains from all of the hand-harvested heads were pooled to give a total sample per plot for each method. The three samples from each plot were completely ground, and subsamples of flour (each weighing ~300 g) were sent for mycotoxin analysis.

**Effect of Grain Storage Procedure.** The effect of the grain storage procedure was investigated on several plots. In each case, subsamples of ~300 g were collected for mycotoxin analysis. Five kinds of storage process were tested: storage at room temperature for 8 months (plots A-C); at 4 °C for 2 months (plots H-J); at -20°C for 2 months (plots H-J); at room temperature for 2 months (plots H- J and M-O); and no storage at all (assay performed immediately after harvest) for all nine plots.

We evaluated the effect of the different harvest and storage methods used by comparing the variances associated with these methods with

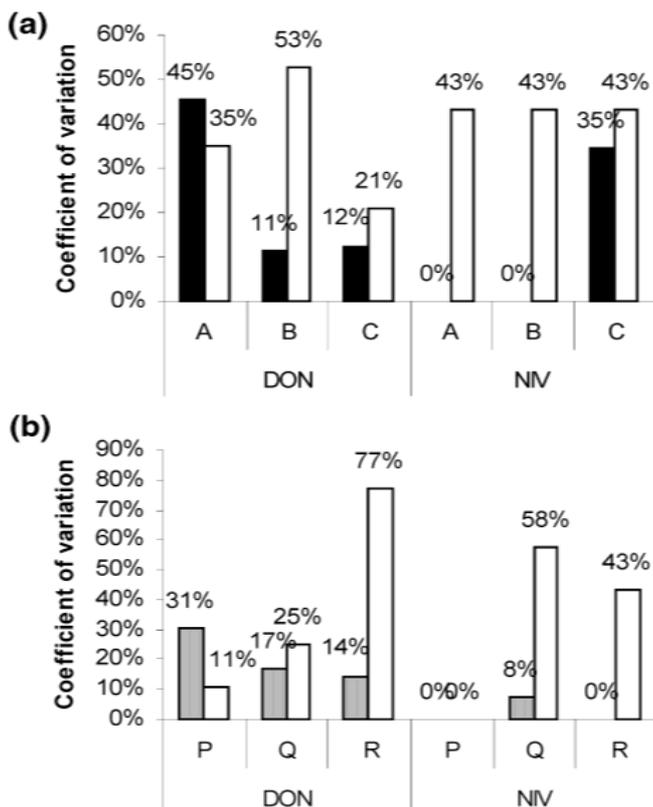
the estimated population variance for each toxin, by means of a  $\chi^2$  test. If a significant effect was observed, Bonferroni correction was applied.

## RESULTS

**Mycotoxin Measurement Uncertainty.** For each sample, the various mycotoxin measurements obtained are presented in **Table 1**. We checked that  $\epsilon_{ij}$  values for deoxynivalenol and nivalenol analyses were randomly distributed (results not shown) and followed a Gaussian distribution: the coefficients of kurtosis and skewness for deoxynivalenol were 0.65 and 0.25, respectively, and those for nivalenol were 2.328 and - 0.23, respectively. This variable with a random effect was therefore normally distributed and independent. No significant differences were observed in the variance of  $\epsilon_{ij}$  (according to Bartlett's test with  $\alpha \leq 35\%$ ) for nivalenol. For deoxynivalenol content, 8 samples (no. 1, 9, 14, 16- 18, 20, and 23) presented  $\epsilon_{ij}$  variances significantly higher than those for the other 16 samples. To take into account the three assumptions on which the model was based, the uncertainty of nivalenol determinations was calculated using all of the samples, whereas that for deoxynivalenol was estimated using the 16 samples for which no significant inequality was observed in the variances of  $\epsilon_{ij}$  (according to Bartlett's test with  $\alpha = 10\%$ ).

For nivalenol, measurement uncertainty was 15 µg/kg (mean square = 956.4), whereas for deoxynivalenol, measurement uncertainty was at least 38 µg/kg (mean square = 153.6). It should be noted that (i) if the samples excluded due to heterogeneity in variance were included, then measurement uncertainty was even higher for deoxynivalenol (81 µg/kg) and (ii) six of the eight samples excluded from the calculation of deoxynivalenol measurement uncertainty corresponded to grain-grain preparations rather than grain- flour or flour- flour preparations.

For plots A- C, the standard deviations of deoxynivalenol and nivalenol measurements were lower after the flour- flour



**Figure 3.** Effect of sample preparation on the variability of mycotoxin contamination measurement for plots A-C (a) and P-R (b): (a) (shaded bars) flour procedure, (white bars) grain procedure; (b) (shaded bars) grain flour procedure, (white bars) grain procedure.

procedure than after the grain-grain procedure, with values of 62 and 5 versus 98 and 9, respectively. With the exception of the deoxynivalenol measurements for plot A, the variability of measurements (estimated by the coefficient of variation on each plot) was lower for analyses on flour samples than for those on grain samples (Figure 3a). For grain samples taken for plots P-R, variability was also lower if subsamples were ground (grain-flour procedure) than if they were not (grain-grain procedure), except for the deoxynivalenol measurements for plot P (Figure 3b). The standard deviations were 54 for deoxynivalenol and 3 for nivalenol for samples sent for analysis in the form of flour, versus 76 and 16, respectively, for samples sent for analysis in the form of grain. The results from plots A-C and P-R therefore suggest that the variability of the mycotoxin measurements may be reduced by early grinding of the samples. The results obtained with the  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + (A_i)_j + \varepsilon_{ijk}$  model provided no evidence of an intrapreparation effect: according to the population variance analysis, the variability of intrapreparation mycotoxin levels (grain or flour) was similar. However, this model revealed an interpreparation effect on deoxynivalenol contamination ( $\alpha = 0.05$ ) for plots A-C and P-R. There was also an interpreparation effect on nivalenol contamination ( $\alpha = 0.01$ ) for plots P-R: mycotoxin contamination levels were higher for grain samples than for flour samples except for nivalenol contamination in plots P-R, for which the opposite result was obtained.

**Effect of Harvest and Sample Storage Methods.** All of the results obtained were very similar (Table 2), but deoxynivalenol and nivalenol levels tended to be higher in cases of manual harvest by the quadrat method than in cases of hundred harvest or mechanical harvest. This trend was confirmed by the  $\chi^2$  test ( $\alpha = 0.10$ ). Bonferroni's test graded ( $\alpha = 0.05$ ) the

**Table 2.** Mycotoxin Contamination Determination According to Harvest Method<sup>a</sup>

		plot			Bonferroni
		P	Q	R	
deoxynivalenol, $\mu\text{g}/\text{kg}$	quadrat harvest	350	600	240	a
	hundred harvest	180	550	160	b
	mechanical harvest	190	550	110	b
nivalenol, $\mu\text{g}/\text{kg}$	quadrat harvest	70	60	90	a
	hundred harvest	< $q_l$	70	60	ab
	mechanical harvest	< $q_l$	80	< $q_l$	b

<sup>a</sup>< $q_l$  = mycotoxin level lower than quantification limit (<60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

**Table 3.** Mycotoxin Contamination According to Type of Storage<sup>a</sup>

Plot	0 months		2 months		8 months
	no conservation	ambient temp	4 °C	-20 °C	
Deoxynivalenol, $\mu\text{g}/\text{kg}$	H	230	240	230	220 240 370 b
	I	800	500	630	
	J	140	140	120	
	A	150	< $q_l$	< $q_l$	
	B	310	600	600	
	C	600	340	340	
Nivalenol, $\mu\text{g}/\text{kg}$	H	< $q_l$	< $q_l$	< $q_l$	< $q_l$ < $q_l$ < $q_l$ b
	I	110	70	90	
	J	70	50	50	
	A	60	< $q_l$	< $q_l$	
	B	440	< $q_l$	< $q_l$	
	C	< $q_l$	< $q_l$	< $q_l$	

<sup>a</sup>No result indicates that no analysis was carried out; < $q_l$  = mycotoxin not detected (<30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); < $q_l$  = mycotoxin level lower than the quantification limit (<60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). a and b: results of Bonferroni correction applied on the three triples H, J, A, C, and M, O.

deoxynivalenol levels obtained by the quadrat method as higher than those obtained by the other methods, and nivalenol levels obtained by the quadrat method were higher than those obtained by the mechanical method.

Deoxynivalenol levels seemed to be lower when measured 2 and 8 months after harvest than when they were measured at harvest (Table 3). This result was confirmed by the results of a  $\chi^2$  test with  $\alpha = 0.10$  and a Bonferroni test ( $\alpha = 0.05$ ) performed on whole plots. A similar trend was observed for nivalenol contamination but was found to be nonsignificant ( $\chi^2$  test with  $\alpha = 0.10$ ) for plots with the four types of storage tested. For plots on which only two types of storage were tested, the type of storage was found to have a significant effect ( $\chi^2$  test with  $\alpha = 0.05$ ) on nivalenol contamination. The results of the Bonferroni test ( $\alpha = 0.05$ ) showed that nivalenol contamination after 8 months of storage was lower than that with no storage, but no difference was observed between 2 months of storage and no storage.

**DISCUSSION**

The results of any assay are biased by measurement uncertainty resulting from the variability of the sample (dependent on the method used to select samples, sample size, and sample quality) and variability of the measurements (dependent on the measurement method, operator, kind of analytical method, and number of analytical measurements) (25, 28). Sampling con-

stitutes the greatest source of error, followed by subsampling and analysis (29).

The laboratory that performed the analysis in this study estimated the variability of its assays at 20%. We found that the measurement uncertainty for a sample, estimated by means of mycotoxin analysis on subsamples, was low: nivalenol determinations were accurate to within 20 µg/kg up to a minimum nivalenol concentration of 60 µg/kg (the quantification limit), and the measurement uncertainty was < 26% of the concentration of nivalenol measured. Thus, the subsampling procedure adopted did not increase the variability of mycotoxin concentrations measured. However, it should be pointed out that these encouraging results were obtained with only a small number of plots. It would also be useful to analyze more highly contaminated samples.

The accuracy of deoxynivalenol measurement was lower, with a measurement uncertainty of up to 40 µg/kg. However, this result corresponds to 22% of the measurement mean, similar to the variability of other analyses. Our results also show that grinding grain as soon as possible may minimize errors. Similar results have been obtained for aflatoxin in shelled peanuts (28) and for deoxynivalenol in wheat (25, 30). Indeed, the trend toward lower variability when samples or subsamples were ground probably reflected the grinding of a larger number of grains than would be the case for a grain sample ground in the laboratory just before testing. This may increase the uniformity of the sample, resulting in lower variability. These findings require confirmation and should be taken into account in future agronomic studies.

The mixed model used made it possible to estimate the mean and the mean square of deoxynivalenol and nivalenol contamination levels of a "field population". We considered the population to be variable, with a random effect. This made it possible to take into account correlations between several measurements carried out on several subsamples originating from a given sample, although we assumed that assays were independent. In fact, subsample content determinations are independent, but measurement results are not themselves independent because analyses were carried out on subsamples taken from the same given initial sample.

Part of the reason for the choice of this model lies in the fact that a model lacking an interaction term between the mycotoxin levels of sample and subsample,  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ijk}$ , may be biased by this interaction, should such an interaction exist. Moreover, a classic model including an interaction between subsample and sample,  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ , may be biased by the independence of subsample assays: in our case, the subsamples are taken from the same sample plot and are therefore not true repetitions, which must be taken from different plots cropped in a similar fashion.

Despite the heterogeneity of mycotoxin content within a field (16), mycotoxin contamination may be analyzed following harvesting by manual means if the heterogeneity of contamination is taken into account by representative sampling, evenly distributed over the entire area of the plot. Taking 10 samples of 100 heads seemed to give better results than analyses of the heads in 9 quadrats made up of 2 rows x 1 m, probably simply because the size of the sample considered was greater.

*Fusarium* mycotoxins are known to be stable to heat and chemical treatments (31, 32), so the lower levels of mycotoxin contamination recorded when toxin levels were not assessed immediately after harvest probably does not correspond to a real decrease, resulting instead from high measurement uncertainty or from changes in the sample during storage. Our

calculations suggest that high measurement uncertainty is not responsible for the observed decrease. The second possibility, that changes occur in the sample during storage, therefore appears to be more likely. Without more data on the question, it is possible, for example, that mould could have either modified the grain samples, and thus the toxin extraction rate, or degraded the toxin with an enzyme such as acetyltransferase Ayt1p (33). This enzyme was found to be responsible for a decrease in the amount of deoxynivalenol 6 weeks after inoculation in a previous study (34). A third explanation is a modification of the ratio of acetonitrile/water during grain storage: this ratio strongly influences the extraction rate of deoxynivalenol and nivalenol and may also explain our results. It would therefore seem to be advisable to sort and grind samples immediately after harvest and, if this is not possible, to minimize the time between harvest and analysis.

These results, which are of potential value for agronomic research, are also likely to be useful for the harmonization of mycotoxin-sampling plans (28). They may also contribute to the standardization of maximum limits, which currently differ among countries (35), and thereby facilitate international trade (28, 36).

## ACKNOWLEDGMENT

We thank Alain Bone for tracking down the references, Alex Edelman & Associates, Stéphanie Pineau, and Guillaume Laffont for editorial advice, and Béatrice Le Fouillen, Christine Souin, and students for their contributions to the experimental work.

## LITERATURE CITED

- (1) Le Boulc'h, V.; Bedouret, S.; Poyet, V.; Barchietto, T.; Hazouard, D.; De Paep, I.; Seng, J. M. Un test innovant pour contrôler la qualité sanitaire des céréales: détection des champignons potentiellement producteurs d'une famille de mycotoxines, les trichothécènes. *AFPP 6<sup>ème</sup> Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes*; Association Française de Protection des Plantes: Tours, France; **2000**; Vol. 1, pp 451-458.
- (2) Galtier, P.; Comera, C.; Oswald, I.; Puel, O. Mycotoxines: origines et toxicités. *AFPP 6<sup>ème</sup> Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes*; Association Française de Protection des Plantes: Tours, France; **2000**; Vol. 1, pp 77-86.
- (3) Gilbert, J.; Tekauz, A. Review: Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* **2000**, *22*, 1-8.
- (4) Placinta, C. M.; D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1999**, *78*, 21-37.
- (5) Chelkowski, J. Fungal pathogens influencing cereal seed quality at harvest. In *Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*; Chelkowski, J., Ed.; Developments in Food Science 26; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **1991**; pp 53-56.
- (6) Thouvenot, D. Moisissure et mycotoxine. In *Mycotoxines: un Prochain enjeu de Sécurité Alimentaire?*; Les Cahiers de Recherche 2; CERAAF: Blois, France, **2002**, pp 14-17.
- (7) Maurin, N.; Chenet, I. Espèces de *Fusarium* présentes dans les cultures de céréales en France. *Phytoma* **1993**, *453*, 20-22.
- (8) Cassini, R. Facteurs favorables ou défavorables au développement des fusarioses et septorioses du blé. *Proceedings of the Meeting of Sections Cereals and Physiology*; Eucarpia: Dijon, France, **1970**; pp 271-279.
- (9) Parry, D. W.; Jenkinson, P.; McLeod, L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals: a review. *Plant Pathol.* **1995**, *44*, 207-238.

- (10) Champeil, A.; Doré, T.; Fourbet, J. F. Review- *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 Sci.* **2004**, *166*, 1389-1415.
- (11) Dill-Macky, R.; Jones, R. K. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 71-76.
- (12) Champeil, A.; Fourbet, J. F.; Doré, T. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Prot.* **2004**, *23*, 531-537.
- (13) Teich, A. H. Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* spp. In *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*; Chelkowski, J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **1989**; pp 269-282.
- (14) Lemmens, M.; Haim, K.; Lew, H.; Ruckebauer, P. The effect of nitrogen fertilization on *Fusarium* head blight development and deoxynivalenol contamination in wheat. *J. Phytopathol.* **2004**, *152*, 1-8.
- (15) Crome, M. G.; Shorter, S. C.; Lauren, D. R.; Sinclair, K. I. Cultivar and crop management influences on fusarium head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* **2002**, *30*, 235-247.
- (16) Raimbault, J. M.; Orlando, D.; Grosjean, F.; Leuillet, M. Méthodes d'échantillonnage et de quantification des mycotoxines Réussir à trouver des aiguilles dans une meule de foin. *Perspect. Agric.* **2002**, *278*, 32-35.
- (17) Whitaker, T. B.; Wiser, E. H. Theoretical investigations into the accuracy of sampling shelled peanuts for aflatoxin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1969**, *46*, 377-379.
- (18) Armitage, D. Grain sampling methods to achieve consumer confidence and food safety. In *HGCA Research ReView*; Home Grown Cereals Authority; London U.K., **2003**.
- (19) Hart, P.; Schabenberger, O. How to sample wheat to accurately determine vomitoxin levels. <http://www.msue.msu.edu/imp/modab/26309701.htm>, 1999; last accessed on Feb 18, **2004**.
- (20) Codex Alimentarius Commission. *Report of the 33rd Session of the Codex Alimentarius Committee on Food Additives and Contaminants*; ALINORM 01/12A; FAO/WHO: Rome, Italy, **2001**; p 300.
- (21) GIPSA. *Grain Fungal Diseases and Mycotoxin Reference*; GIPSA, Technical Services Division: Kansas City, MO, **1999**; p 54.
- (22) Feinberg, M. *La Validation des Méthodes d'Analyse-Une Approche Chimio-métrique de l'Assurance Qualité au Laboratoire*; Masson: Paris, France, **1996**; p 397.
- (23) ISO. *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; 2001 ALINORM 01/23; **1993**.
- (24) Codex Alimentarius Commission. *Report of the 23rd Session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling*; ALINORM 01/23; FAO/WHO: Rome, Italy, **2001**; p 51.
- (25) Hart, L. P. Variability of vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year. *Plant Dis.* **1998**, *82*, 625-630.
- (26) Commission Directive. Commission directive 98/53/EC of the 16 July 1998 on laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Of. J. Eur. Communities* **1998**, *201*, 93-101.
- (27) Commission Directive. Commission directive 2002/27/EC of the 13 March 2002 amending Directive 98/83/EC on laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Of. J. Eur. Communities* **2002**, *75*, 44-45.
- (28) Whitaker, T. B. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: An urgent necessity. *Food Control* **2003**, *14*, 233-237.
- (29) Whitaker, T. B.; Dickens, J. W. Variability of aflatoxin test results. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, *51*, 214-218.
- (30) Whitaker, T. B.; Hagler, W. M., Jr.; Giesbrecht, F. G.; Johansson, A. S. Sampling, sample preparation, and analytical variability associated with testing wheat for deoxynivalenol. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 1285-1292.
- (31) Vidal, D. R. Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothécènes. *Bull. Inst. Pasteur* **1990**, *88*, 159-192.
- (32) Quillien, J. F. *Les Mycotoxines*; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre de Réseaux pour l'Innovation en Agriculture et Agroalimentaire (CRIAA): Rennes, France, **2002**, p 24.
- (33) Mitterbauer, R.; Adam, G. *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: Useful model systems for the identification of molecular mechanisms involved in resistance of plants to toxins. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 699-703.
- (34) Miller, J. D.; Young, J. C. Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. *Can. J. Plant Pathol.* **1985**, *7*, 132-134.
- (35) Food and Agriculture Organization. *Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995-A Compendium*; FAO Food and Nutrition: Rome, Italy, **1997**; p 64.
- (36) FAO/WHO/UNEP. *Report of the Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins*; MYC-CONF/99/REPe; FAO/WHO/UNEP International: Rome, Italy, **1999**; p 22.

---

Received for review April 19, 2004. Revised manuscript received July 23, 2004. Accepted July 23, 2004. This research was funded by the DGAL (French Ministry of Agriculture) and by INRA.

JF049374S



**Tableau 4-1 : Contamination en mycotoxines des organes végétatifs des épis (balles et rachis) et des grains, à différents stades au cours du remplissage des grains**

(a) Année de culture 2001-02

Mycotoxines	Parcelles	Farine de balles+rachis		Farine de grains	
		70% remplissage	70% remplissage	Récolte	
Déoxynivalénol, µg/kg	AIII	1000	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	
	BIII	600	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	
	BIV	1700	<d <sub>l</sub>	60	
	CI	1700	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	
	CIV	800	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	
Nivalénol, µg/kg	AIII	300	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	
	BIII	800	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	
	BIV	2100	<d <sub>l</sub>	140	
	CI	220	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	
	CIV	600	<d <sub>l</sub>	120	

Pas de 15-acétyldéoxynivalénol, ni de fusarénone X détectées en 2001-2002.

(b) Année de culture 2002-03

Mycotoxines	Parcelles	Bloc	Farine de balles+rachis		Farine de grains		Récolte
			10% remplissage	90% remplissage	10% remplissage	90% remplissage	
Déoxynivalénol µg/kg	BV		650	2800	120	130	120
	BVI		800	2600	150	330	200
	BVII		non analysé	<d <sub>l</sub>	40	90	60
	BVIII		non analysé	<d <sub>l</sub>	40	120	70
	CV		700	3200	100	160	200
	DVI		1700	non analysé	100	non analysé	210
	EIII		5200	non analysé	450	non analysé	270
	EIV		2700	non analysé	250	non analysé	850
	EVI		420	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	Conventionnel	I	1000	3800	150	210	190
	Conventionnel sf	I	320	2800	110	130	250
	Biologique <i>Charger</i>	I	280	2400	130	500	110
	Biologique <i>Apache</i>	I	200	1800	90	70	110
	Nivalénol µg/kg	BV		440	410	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
BVI			460	800	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
BVII			non analysé	460	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
BVIII			non analysé	460	<d <sub>l</sub>	170	80
CV			1200	1900	140	70	90
DVI			320	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
EIII			720	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
EIV			<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
EVI			<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
Conventionnel		I	1300	950	<d <sub>l</sub>	60	<q <sub>l</sub>
Conventionnel sf		I	550	2000	90	100	120
Biologique <i>Charger</i>		I	200	1200	60	100	<q <sub>l</sub>
Biologique <i>Apache</i>		I	280	550	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>

<d<sub>l</sub> : teneur en toxines inférieure à la limite de détection (< 30 µg/kg) ; <q<sub>l</sub> : teneur en toxines inférieure à la limite de quantification (< 60 µg/kg). sf : sans fongicide ; *Charger* et *Apache* sont les variétés cultivées dans les différents systèmes de culture de l'essai systèmes.

## 2- Effet de la date de prélèvement des échantillons et du type d'organe analysé sur la teneur en mycotoxines mesurée

### 2.1- Matériels et méthodes spécifiques

Pour cette partie de notre travail, des prélèvements manuels spécifiques ont été réalisés (comme décrit dans l'article ci-dessus) à différents stades du remplissage des grains, d'une part sur différentes parcelles agricoles de notre réseau (cinq parcelles en 2001-02, et neuf en 2002-03), et d'autre part sur différentes parcelles de notre essai systèmes. Les épis récoltés ont été séchés et battus comme d'habitude. En 2001-02, nous manquions de temps, du fait du très lourd travail entrepris sur les adventices, et nous avons donc attendu de voir apparaître quelques symptômes de fusariose sur les épis avant de faire un prélèvement : celui-ci a finalement été réalisé à environ 70% du remplissage des grains. En 2002-03, nous avons fait deux prélèvements en cours de remplissage. Certaines parcelles présentant des symptômes de fusariose dès la floraison, nous avons réalisé le premier prélèvement seulement 15 jours après la floraison (à environ 10% de remplissage). Le second prélèvement a été réalisé 3 semaines après, à un moment où nous espérions initialement nous trouver à environ 70% de remplissage comme l'année précédente ; mais la sécheresse et la chaleur de l'été 2003 ayant accéléré le remplissage des grains, les parcelles se sont retrouvées en majorité à environ 90% de remplissage des grains, certaines (les parcelles des exploitations D et E) ont même été complètement récoltées à cette date (**Tableau 4-1**). Après prélèvement, les grains ont ensuite été séparés (mécaniquement et manuellement) des autres organes de l'épi. Tous les échantillons des deux types d'organe (grains *versus* enveloppes et rachis) ont été broyés, et un dosage de mycotoxines a été réalisé comme décrit au chapitre 3.

### 2.2- Résultats

Nous avons mesuré, dans les grains d'un côté, dans les balles plus le rachis de l'autre, les niveaux de contamination par les mycotoxines fusariennes et leur évolution au cours du remplissage des grains. Quatre mycotoxines fusariennes ont été détectées (15-acétyldéoxynivalénol, déoxynivalénol, nivalénol et fusarénone X), pour lesquelles les résultats sont présentés dans le **Tableau 4-1**. Aucun dosage de zéaralénone, de trichothécènes du groupe A, ou de 3-acétyldéoxynivalénol (trichothécènes du groupe B) ne s'est révélé positif.

Les contaminations en déoxynivalénol, nivalénol et 15-acétyldéoxynivalénol sont significativement plus importantes dans les organes de l'épi autres que les grains que dans les grains eux-mêmes (d'après une analyse de variance,  $\alpha < 0,001$ ). Quant aux deux autres toxines détectées, le 15-acétyldéoxynivalénol et la fusarénone X, elles ne sont détectées que dans les glumes et les rachis, jamais dans les grains eux-mêmes.

De plus, les niveaux de contamination en mycotoxines sont plus élevés en fin de remplissage des grains qu'en début de remplissage (à six exceptions près en 2002-03 : dans les grains, cas du déoxynivalénol dans la parcelle de Biologique *Apache* et cas du nivalénol dans la parcelle CV ; dans les glumes et rachis, cas du nivalénol dans les parcelles BV et système conventionnel, et cas du 15-acétyldéoxynivalénol dans la parcelle système conventionnel), et sont généralement (mais pas systématiquement) plus élevés à la récolte qu'en cours de remplissage. Il semble que les périodes de début de contamination ont été assez différentes pour les deux années : contamination des grains tardive en 2001-02, puisque à 70% de leur remplissage aucune parcelle ne présentait encore de grains contaminés (alors qu'à la récolte certaines d'entre elles en présentaient) ; contamination plus précoce en 2002-03, puisque après seulement 10% de remplissage des grains, les grains et les glumes-rachis de la majorité des parcelles étaient déjà contaminés.

## (c) Année de culture 2002-03 – 15-acétyldéoxynivalénol et fusarénone X

Mycotoxines	Parcelles	Bloc	Farine de balles+rachis		Farine de grains		Récolte
			10% remplissage	90% remplissage	10% remplissage	90% remplissage	
15-acétyl deoxynivalénol µg/kg	BV		420	750	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BVI		680	950	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BVII		non analysé	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BVIII		non analysé	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	CV		550	1000	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	DVI		240	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	EIII		2600	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	EIV		1100	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	EVI		<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	Conventionnel	I	500	300	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Conventionnel sf	I	<d <sub>l</sub>	340	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Biologique <i>Charger</i>	I	<d <sub>l</sub>	360	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Biologique <i>Apache</i>	I	<d <sub>l</sub>	260	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
Fusarénone X, µg/kg	BV		<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BVI		<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BVII		non analysé	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BVIII		non analysé	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	CV		<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	DVI		<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	EIII		<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	EIV		<q <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	EVI		160	non analysé	<d <sub>l</sub>	non analysé	<d <sub>l</sub>
	Conventionnel	I	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Conventionnel sf	I	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Biologique <i>Charger</i>	I	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Biologique <i>Apache</i>	I	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>

<d<sub>l</sub>: teneur en toxines inférieure à la limite de détection (< 30 µg/kg); <q<sub>l</sub>: teneur en toxines inférieure à la limite de quantification (< 60 µg/kg). sf : sans fongicide; *Charger* et *Apache* sont les variétés cultivées dans les différents systèmes de culture de l'essai systèmes.

Les glumes et rachis se révèlent significativement plus contaminés par le 15-acétyldéoxynivalénol ( $\alpha < 0,05$ ) et la fusarénone X ( $\alpha < 0,001$ ) en début de remplissage qu'en fin de remplissage, et inversement ils sont plus contaminés par le déoxynivalénol ( $\alpha < 0,05$ ) en fin de remplissage qu'en début de remplissage, selon une analyse de variance de l'effet de la date de prélèvement. Pour les autres toxines, comme pour la contamination des grains, aucun effet n'est mis en évidence.

### 3- Discussion - Conclusion

En l'absence de référence antérieure sur les procédures d'échantillonnage, cette première partie de notre travail visait à évaluer les incertitudes sur la teneur en toxines d'un lot de grains en fonction des modalités de constitution et de préparation de ce lot. Notre étude de la variabilité intrinsèque des échantillons montre que les méthodes de prélèvement manuel que nous avons utilisées (sur des parcelles de 0,5 ha) ne sont pas entachées d'un niveau d'erreur différent de celui obtenu à la suite d'une récolte machine (qui constitue la méthode de référence). Lors des récoltes manuelles en parcelles agricoles (zones de 300-400 m<sup>2</sup>), **la représentativité de notre échantillonnage est donc assurée.**

**On peut noter, pour chacune des mycotoxines détectées, que la contamination des grains évolue au cours de leur remplissage.** Le petit nombre de mesures réalisées ne nous permet cependant ni d'identifier les déterminants de cette évolution, ni de mettre en rapport la cinétique de contamination observée et les stades de remplissage des grains, c'est-à-dire d'établir un rapport entre la production de toxines et le stade des grains. On ne peut donc ni conclure sur le stade qui induit la plus forte modification de la contamination par une toxine donnée, ni prédire à l'avance le niveau de contamination d'une parcelle.

La représentativité des échantillons étant assurée, l'absence de corrélation stricte observée entre le stade de remplissage des grains et leur contamination en toxines doit vraisemblablement être lié à des dates d'infection différentes. En outre, de nombreux paramètres pourraient influencer sur la vitesse à laquelle les champignons migrent de l'enveloppe des épis vers le grain (le microclimat au niveau de l'épi, la compétition avec les autres microorganismes, la disponibilité en nutriments pour le champignon, ou encore la résistance de la variété de blé, qui pourrait elle-même dépendre de son alimentation en éléments minéraux).

L'existence d'un lien entre les niveaux de contaminations des grains et ceux du reste de l'épi et plus généralement la question de la migration des champignons et des toxines des enveloppes vers les grains est évidemment une question centrale, sur laquelle beaucoup de travail reste à faire. Mais une conclusion pratique de notre étude est que **le nettoyage des grains apparaît être une étape particulièrement importante de la procédure d'échantillonnage pour le dosage des toxines** : la comparaison des niveaux de contamination des grains de deux parcelles nécessite d'éliminer la contamination résultant des poussières ou d'organes végétatifs des épis. En effet, les glumes et rachis sont infiniment plus contaminés que les grains eux-mêmes, sans qu'aucune relation stricte entre les niveaux de contamination de ces différents organes ne soit notée. Aussi, toute présence de poussières ou de glumes-rachis en proportion *a priori* inégale dans les échantillons à comparer pourrait grandement modifier les niveaux de contamination des échantillons analyser, et donc le classement des parcelles. Ce résultat confirme ce qui a déjà été obtenu (Grosjean *et al.*, 2002).

Par ailleurs, comme on pouvait s'y attendre, **le broyage d'un maximum de grains semble permettre de réduire les incertitudes de mesure.** Ce résultat est conforme à d'autres obtenus pour les

aflatoxines dans les arachides (Whitaker, 2003) et pour le déoxynivalénol dans le blé (Hart, 1998 ; Whitaker *et al.*, 2000).

Ces différentes conclusions ayant été acquises à la suite de notre première campagne de prélèvement (2001-02), le tri manuel des échantillons et leur broyage ont été systématiquement pratiqués au cours de la deuxième année d'étude (2002-03), pour tous les dispositifs. Les prélèvements des échantillons pour le dosage des toxines ont donc été réalisés de façon assez différente durant ces deux années successives, et dans la mesure du possible nous analyserons les résultats de ces deux années de façon séparée.

Par ailleurs, il semble que le mode de conservation des grains (durée et température) entre la récolte et le dosage des toxines pourrait également intervenir sur le résultat mesuré (sans que l'on comprenne encore bien pourquoi). Une mauvaise homogénéisation des échantillons après stockage pourrait expliquer les résultats ambigus acquis sur les effets de la conservation des échantillons. De fait, dans nos études nous n'avons pas conservé les grains plus de 3 semaines avant analyse.

Tous les dosages des trichothécènes ont été réalisés dans un même laboratoire d'analyse, avec une même méthode, décrite au chapitre 3 et considérée comme la plus fiable à l'heure actuelle. Sous l'hypothèse faite dans ce chapitre que la variabilité des contaminations observées entre les 15 parcelles échantillonnées correspond bien à la variabilité pour l'ensemble de la population des parcelles, nous avons trouvé que **l'incertitude de mesure du déoxynivalénol et du nivalénol entre différents échantillons d'un même lot prélevé sur la parcelle**, est estimée assez faible, respectivement  $\pm 38 \mu\text{g/kg}$  et  $\pm 15 \mu\text{g/kg}$ , et **ne dépassait guère l'incertitude d'analyse annoncée par le laboratoire :  $\pm 20 \%$** . Nous supposons donc que nos prélèvements sont bien représentatifs des parcelles. Cette incertitude servira par ailleurs de référence dans la suite de l'étude pour comparer et classer les différentes parcelles

*Résumons ce chapitre : pour le dosage des mycotoxines dans une étude agronomique des niveaux de contamination de différentes parcelles, on peut proposer les recommandations suivantes :*

- réaliser les prélèvements le plus tard possible (à la récolte),
- prélever les épis (mécaniquement ou manuellement) sur toute la parcelle et de façon suffisamment conséquente (autour d'un kilogramme de grains),
- nettoyer les grains le plus finement possible, pour éliminer balles, rachis et poussière,
- broyer l'ensemble des grains récoltés,
- homogénéiser avant chaque échantillonnage,
- conserver le moins longtemps possible avant analyse,
- enfin, doser les toxines une méthode la plus fiable possible (par exemple une chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse).

En dehors de ces questions de procédure, les différents résultats obtenus amènent à s'interroger sur la dynamique de contamination par les champignons et la dynamique de production des toxines, sujets que nous n'aborderons pas directement dans la thèse :

- de quels facteurs dépend la propagation du champignon ?
- quels sont les facteurs qui influencent la nature des toxines produites ?
- quels sont les déterminants de la production des toxines ?
- la production de toxines précède-t-elle la propagation du champignon, ou est-ce l'inverse ?

Par ailleurs, plusieurs variétés (*Apache, Renan, Aristos* et *Charger*) ont été utilisées pour obtenir ces résultats. Or, certains génotypes de plantes sont connus pour leur capacité à dégrader le déoxynivalénol au cours du remplissage des grains. Dans ce cas, la quantité de toxines mesurée est le résultat de la balance entre production et dégradation des toxines. Ce qui amène donc plusieurs autres questions, qui dépassent bien sûr également le cadre de cette thèse :

- Les différents génotypes ont-ils une influence sur l'hétérogénéité de la contamination des grains : par exemple, les génotypes pour lesquels la vitesse de migration des toxines est grande contaminent-ils les grains de façon plus homogène que ceux dont la migration des toxines est plus lente ?
- Dans les génotypes qui ne sont pas répertoriés comme capable de dégrader le déoxynivalénol, dose-t-on directement une production ou bien également également une production suivie d'une dégradation (qui peut être moins rapide ou moins efficace suivant le génotype) ?
- La cinétique de la dégradation est-elle uniquement liée à la variété, ou bien dépend-elle d'autres éléments, et si oui lesquels ?
- Que deviennent les produits de dégradations des toxines ? En quoi les toxines sont-elles transformées ? Selon quelle cinétique ? Et les produits dégradés ont-ils une toxicité propre ?



## Chapitre 5 - Relations entre les niveaux d'attaque des épis par la fusariose, les niveaux de contamination des grains par les mycotoxines, et les pratiques agricoles

Pour améliorer la conduite des cultures de blé en vue d'une diminution des niveaux de fusariose et/ou de toxines fusariennes, il nous faut comprendre quelles techniques ou combinaisons de techniques peuvent participer au développement des champignons et/ou de la production des toxines. Nous avons, pour cela, comme déjà dit, utilisé la méthode du diagnostic agronomique régional (Sebillotte, 1978a ; Doré *et al.*, 1997).

La première étape du diagnostic agronomique régional consiste à définir la zone d'étude et à sélectionner des parcelles agricoles qui seront suivies (Doré *et al.*, 1997). Le choix des parcelles d'un réseau doit être fait en vue de satisfaire à deux critères (Meynard *et al.*, 1996 ; Doré *et al.*, 1997) : (i) des conditions environnementales variées, recouvrant les diverses situations rencontrées dans la région d'étude et (ii) des modes de conduite des cultures variés, couvrant la diversité des systèmes de culture de la zone d'étude. Les connaissances déjà disponibles sur la sensibilité des cultures aux différences environnementales et sur les modes de conduite des cultures vis-à-vis de la maladie et de la production de toxines sont également à prendre en compte dans le choix des parcelles. Ces deux derniers éléments ont été évoqués précédemment (la sensibilité des cultures à leurs environnements au chapitre 1 et les modes de conduites des cultures au chapitre 3).

Classiquement, le diagnostic agronomique s'effectue en deux étapes. Tout d'abord, il s'agit de comprendre quels "états du milieu" (généralement décrits par des caractéristiques environnementales des cultures, climatiques ou nutritives) sont déterminants des niveaux d'attaque et de contamination. Ensuite, il faut identifier les pratiques culturales des agriculteurs qui ont pu intervenir dans la détermination de ces "états".

Dans les chapitres 1 et 2, de nombreuses questions à éclaircir ont été énoncées, et nous essaierons d'apporter notre contribution à cet éclaircissement. Pour plus de clarté, nous appliquerons la méthode du diagnostic agronomique à nos deux dispositifs séparément (le réseau de parcelles agricoles biologiques, puis l'essai de longue durée), avant de synthétiser les résultats obtenus sur l'ensemble des deux dispositifs. Sur chacun d'eux, la démarche appliquée consiste à regarder tout d'abord, sur les différentes parcelles, les associations existantes entre les diverses pratiques culturales employées par les agriculteurs, afin notamment de rendre compte des interactions entre ces pratiques. Puis, les effets du climat, du sol et/ou des techniques utilisées sur les niveaux d'attaque et/ou de contamination de nos parcelles seront confrontés à ceux décrits dans la littérature. Enfin, nous analyserons les effets des différents "états du couvert" (les effets des variables décrivant le fonctionnement du peuplement) sur les niveaux d'attaque et/ou de contamination des cultures, car nous soupçonnons leur implication dans la détermination de ces niveaux.

**Nous ne connaissons pas les déterminants et les processus de l'élaboration de la teneur en mycotoxine ou du développement de la fusariose.** Par rapport aux étapes du diagnostic, **notre objectif** (première étape de la démarche du diagnostic) **consiste à rechercher un lien entre les caractéristiques environnementales ou de fonctionnement des couverts végétaux et les niveaux d'attaque et de contamination.** Comme de nombreux éléments pourraient intervenir et masquer les effets potentiellement existants, nous avons adapté la méthode du diagnostic agronomique communément utilisée sur la *totalité* des parcelles d'un réseau (Doré, 1992 ; Savary *et al.*, 1994 ; Barbottin, 2004) pour travailler sur des *regroupements* de parcelles (Diouf, 1990) se distinguant par

**Tableau 5-1-1 : Caractérisation du climat observé dans les différentes exploitations du réseau**

Année Exploitation	Cumul des précipitations (mm)				Moyenne des températures						Moyenne des humidités		Moyenne du rayonnement journalier (Joules/cm <sup>2</sup> )				
	températures moyennes journalières (°C, base 0)				minimales journalières (°C)		moyennes journalières (°C)		maximales journalières (°C)		maximales journalières (%)		minimales journalières (%)				
	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	
2001-02	A	318	296	1062	1523	4,2	7,6	7,0	12,9	10,6	18,7	95	nd	72	nd	471	1550
	B	294	274	1037	1790	4,0	7,4	6,9	12,6	10,2	18,4	nd	94	nd	53	nd	nd
	C	297	275	1008	1982	3,5	7,1	6,8	13,0	10,7	19,4	94	93	68	47	270	1629
	D	299	200	1030	1733	3,7	7,7	7,1	13,3	10,9	19,3	97	96	67	64	1131	1220
	E	290	200	1054	1669	4,2	8,2	7,0	13,1	10,7	19,2	92	95	57	54	1182	1580
2002-03	A	442	220	978	2238	3,7	9,2	6,4	14,6	9,7	20,8	92	89	71	45	453	1786
	B	425	168	927	1960	3,2	8,4	6,2	14,2	9,5	20,6	95	93	74	46	nd	nd
	C	435	226	927	2178	2,8	7,9	6,2	14,2	9,9	21,1	95	93	67	42	445	1756
	D	254	182	921	2295	3,1	9,1	6,4	15,2	10,3	21,5	96	95	57	69	1381	814
	E	364	156	913	2256	3,4	9,5	6,3	15,1	10,0	21,4	95	88	73	44	420	1743

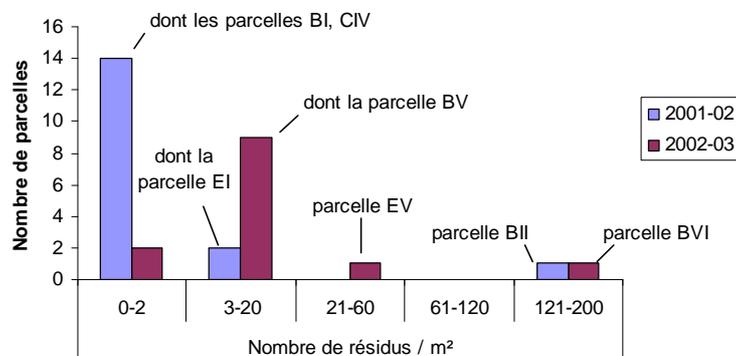
Oct-fév. : période “hivernale” du 1<sup>er</sup> octobre au 28 février. Mar-juil. : période “estivale” du 1<sup>er</sup> mars au 31 juillet, nd non déterminé

**Tableau 5-1-2 : Classification des types de sol des différentes parcelles agricoles biologiques**

Matière organique, g/kg	Texture Argilo-Limoneuse	Texture Limoneuse	Texture Sableuse	Texture Argilo-calcaire
5-15	EII <sup>1</sup>	BIII <sup>1</sup> , EI <sup>1</sup>	EVI <sup>2</sup>	
15-25	AI <sup>1</sup> , AII <sup>1</sup> , BI <sup>1</sup> , BIV <sup>1</sup> , DI <sup>1</sup> , DII <sup>1</sup> , DIII <sup>1</sup> , DIV <sup>1</sup> , BVIII <sup>2</sup> , EV <sup>2</sup>	AIII <sup>1</sup> , CIII <sup>1</sup> , CIV <sup>1</sup> , AIV <sup>2</sup> , CV <sup>2</sup> , EIII <sup>2</sup> , EIV <sup>2</sup>		
25-35	BV <sup>2</sup> , BVI <sup>2</sup> , BVII <sup>2</sup> , CVI <sup>2</sup> , DV <sup>2</sup>			
35-45			CI <sup>1</sup> , CII <sup>1</sup>	DVI <sup>2</sup>
45-55	BII <sup>1</sup>			

<sup>1</sup> parcelles de l'année 2001-02, <sup>2</sup> parcelles de l'année 2002-03

**Figure 5-1-1 : Résidus des précédents culturaux sur les parcelles agricoles biologiques à la sortie de l'hiver**



Seules les parcelles suivant une culture de maïs sont nommées, ainsi que les parcelles à très forte densité de résidus (la parcelle BII suivait une culture de blé et EV une culture de trèfle).

leurs environnements et/ou les pratiques agricoles employées.

## 1- Influence des systèmes de culture sur les parcelles agricoles biologiques

### 1.1- Caractérisation des parcelles du réseau en agriculture biologique

#### 1.1.1- Conditions environnementales des parcelles

##### *Conditions climatiques générales des campagnes d'étude*

La caractérisation des variables climatiques (pluviométrie, température, humidité et rayonnement), réputées déterminantes dans la bibliographie réalisée (**Chapitre 1**), permet de constater qu'il n'y a pas eu de grandes différences climatiques entre les années 2001-02 et 2002-03 (**Tableau 5-1-1**). Les hivers ont été doux (la moyenne des températures moyennes journalières varie de 6,2 à 7,1°C). Les printemps-été (de mars à juillet) ont été plutôt chauds (températures maximales journalières autour de 20°C, de 18,4 à 21,5°C). Les années d'étude ont été légèrement sèches : autour de 560 mm de précipitations annuelles (en général dans la région, elles se situent autour de 650 mm). A noter que les exploitations A et B, dans le nord-ouest de l'Île-de-France (**Figure 3-1**), sont soumises à un climat moins pluvieux que l'exploitation E, tandis que sur les autres exploitations on observe une pluviométrie intermédiaire.

##### *Caractérisation édaphique des parcelles*

Les différents types de sol sont classés selon leur texture et leur teneur en matière organique (**Tableau 5-1-2**). Une majorité des parcelles suivies possède un sol argilo-limoneux ou limoneux profond avec peu de matière organique, tandis que quelques parcelles se trouvent sur des terrains sableux ou calcaires. Certaines parcelles présentent un sol assez riche en matière organique (plus de 30 g/kg selon Calvet, 2003). Enfin, l'**Annexe 2** présente les différents éléments chimiques constituant le sol.

#### 1.1.2- Caractérisation des états du couvert végétal

##### *Densité de résidus à la sortie de l'hiver*

La plupart des parcelles suivies (16 sur 17 en 2001-02 et 11 sur 13 en 2002-03) présentent très peu de résidus de précédents culturaux (moins de 20 par m<sup>2</sup>) ; et ce même quand elles suivent des cultures de maïs (**Figure 5-1-1**). Les parcelles BII et BVI font exception en présentant une grande quantité de résidus sur le sol, résultant d'une absence de labour sur ces parcelles (toutes les autres parcelles ont été labourées). Une autre parcelle présente une importante quantité de résidus végétaux en surface (EV) alors qu'elle a été labourée et qu'elle n'avait pas été cultivée avec une culture laissant *a priori* beaucoup de résidus. Cette situation a probablement pour origine un mauvais réglage de la charrue lors du labour (en raison du terrain très pentu de la parcelle).

##### *Caractérisation générale des cultures*

Au stade floraison (stade clé pour la contamination des épis, selon la littérature), la densité du couvert (caractérisée par le nombre d'épis et la matière sèche aérienne par m<sup>2</sup>) est assez différente d'une parcelle à une autre (de 200 à 500 épis par m<sup>2</sup> et de 500 à 2000 g de matière sèche aérienne du blé par m<sup>2</sup>) et relativement similaire lors des deux années d'étude (**Tableau 5-1-3**). Certaines parcelles présentent de très faibles densités de blé, qui résultent de mauvaises levées et probablement de carences azotées n'ayant pas permis de compensation de la levée par tallage (**Tableau 3-4**). En effet, les carences en azote dans les plantes diminuent le nombre de talles émises et la montée des talles en épi (Masle-Meynard, 1980).

**Tableau 5-1-3 : Répartition des parcelles agricoles biologiques selon l'état du couvert végétal à floraison**

Nombre d'épis de blé /m <sup>2</sup>	Matière sèche aérienne de blé, g/m <sup>2</sup>	Taux de recouvrement du sol par les adventices	Hauteur des épis de blé, cm	Indice de nutrition azotée		
				< 0,5	0,5-0,9	0,9-1,1
200-500	0-500	0-30 %	0-50	EI <sup>1</sup> , BI <sup>1</sup> , EVI <sup>2</sup>		
			50-75	BV <sup>2</sup> , BVI <sup>2</sup> , BVII <sup>2</sup> , BVIII <sup>2</sup>		
		30-60 %	75-100	CI <sup>1</sup>		
			50-75	AIII <sup>1</sup> , AIV <sup>2</sup> , BIV <sup>1</sup>		EV <sup>2</sup>
	500-1000	0-30 %	75-100	EIV <sup>2</sup>		
			50-75	BII <sup>1</sup> , CII <sup>1</sup> , CIV <sup>1</sup>		
		30-60 %	50-75	AI <sup>1</sup> , BIII <sup>1</sup> , DIII <sup>1</sup> , DIV <sup>1</sup>		AI <sup>1</sup>
			75-100	DII <sup>1</sup>		
	1000-2000	0-30 %	50-75	CIII <sup>1</sup>		
			75-100	CVI <sup>2</sup> , EII <sup>1</sup>		
30-60 %		50-75	DI <sup>1</sup>		EIII <sup>2</sup>	
		75-100			DVI <sup>2</sup>	
500-800	500-1000	0-30 %	50-75			
	1000-2000	0-30 %	50-75	DI <sup>1</sup>		EIII <sup>2</sup>
			75-100			CV <sup>2</sup>
						DV <sup>2</sup>

<sup>1</sup> parcelles de l'année 2001-02, <sup>2</sup> parcelles de l'année 2002-03

**Tableau 5-1-4 : Composition chimique des épis et/ou des grains**

a- Distribution des parcelles selon la teneur en azote, phosphore, potassium, magnésium.

Teneur, g/kg de matière sèche	Epis à la floraison (nb de parcelles)	Grains à 70% du remplissage (nb de parcelles)	Grains à la récolte (nb de parcelles)	Indice de nutrition azotée dans les épis à la floraison (gamme de variation)	Teneur en protéines des grains à la récolte (gamme de variation)	
Azote 2001-02	10-15	11	15	13	0,3 à 0,4	6 à 9%
	15-20	6	2	4	0,4 à 0,6	9 à 11%
Azote 2002-03	10-15	8	5	3	0,2 à 0,6	7 à 8%
	15-20	5	7	4	0,6 à 1	10 à 11%
	20-25		1	4		12 à 13%
	25-30			2		15%
Phosphore 2002-03	2,5-3,5	13	4	1		
	3,5-4,5		9	12		
Potassium 2002-03	4-5		11	13		
	6-10	9	2			
	11-14	4				
Magnésium 2002-03	0,8-1	9	1	1		
	1,1-1,2	4	10	8		
	1,2-1,4		2	4		

b- Teneur en sucres des grains (glucose, fructose, saccharose) en 2002-03 (nombre de parcelles)

Teneur, g/kg	Glucose			Fructose			Saccharose		
	Floraison	Remplissage	Récolte	Floraison	Remplissage	Récolte	Floraison	Remplissage	Récolte
0,15-0,50		2	13			13			
0,5-1,5		11			8				
1,5-5	3				5				
5-10	5			2			1	10	9
10-15	5			8			4	3	4
15-20				3			3		
25-30							3		
35-40							1		
40-45							1		

A la floraison du blé, les adventices les plus rencontrées sont de la famille des *Poaceae* (pâturin, agrostis et vulpin en 2001-02, ray-grass et pâturin en 2002-03), des *Asteraceae* (chardon pour les deux années, et laiteron en 2002-03), et des *Fabaceae* (trèfle en 2001-02). Toutes ces espèces ont été caractérisées comme étant des hôtes potentiels de *Fusarium* (**Tableau 2** du chapitre 1) et peuvent donc potentiellement être une source d'inoculum. Par ailleurs, elles peuvent aussi modifier le microclimat du couvert, le rendant par exemple plus humide et donc favorisant probablement la germination des spores. Nous notons qu'à la floraison, le recouvrement surfacique des parcelles par les adventices est plus important en 2001-02 (de 0 à 60% de recouvrement) que celle de 2002-03 (de 0 à 30% de recouvrement, **Tableau 5-1-3**). La matière sèche (données non montrées) est moins importante en 2001-02 (de 1 à 64 g/m<sup>2</sup>) qu'en 2002-03 (de 9 à 97 g/m<sup>2</sup>). Cependant, même lors de la 2<sup>ème</sup> année, la contribution de la matière sèche correspondant aux adventices est faible (inférieure au 1/5<sup>ème</sup> de la matière sèche totale -blé + adventices-), et peut donc être *a priori* négligée dans la recherche des effets de la densité du couvert sur les niveaux d'attaque de la maladie et/ou sur la contamination en mycotoxines des grains. L'hétérogénéité des peuplements d'adventices à l'intérieur de chaque parcelle, en terme d'espèces présentes, de densité, de hauteur et/ou de stade de développement, associée à l'absence d'éléments bibliographiques précis sur les effets de cet aspect du couvert végétal ne permet cependant guère d'interpréter les données obtenues.

En 2001-02, un nombre très important de parcelles (15 sur 17) ont présenté des épis de blé relativement proches du sol (à moins de 50-60 cm du sol en moyenne), tandis qu'en 2002-03, les épis ont été plus hauts : deux des parcelles présentent ainsi des épis à plus de 85 cm du sol (parcelles CV et DV avec des hauteurs moyennes d'épis respectivement à 97 et 86 cm du sol, **Tableau 5-1-3**).

La majorité des parcelles suivies se trouvent déjà en état de carence azotée au stade "épi 1 cm" (résultat non montré), comme à la floraison (**Tableau 5-1-3**). Ces résultats sont conformes à d'autres également obtenus sur des parcelles agricoles biologiques et pour lesquelles les indices de nutrition azotée à la floraison variaient de 0,22 à 0,68 (David, 2004). En 2002-03, certaines parcelles présentent des niveaux de carence en azote faibles, mais deux parcelles (DV et DVI) sont même à l'optimum de nutrition azotée.

Des gammes de variation importantes de la teneur en azote des grains sont observées à la récolte (**Tableau 5-1-4a**). La teneur en phosphore apparaît comme plus variable à la récolte qu'à la floraison, tandis que les autres éléments (potassium, magnésium, glucose, fructose et saccharose) présentent des taux plus variables à la floraison qu'à la récolte (**Tableau 5-1-4**). Ces résultats seront mis en relation avec le stade de sensibilité des plantes à la fusariose dans la partie 3 de ce chapitre.

#### ***Caractérisation des maladies attaquant les cultures***

Les principales maladies rencontrées sur les parcelles suivies présentent des niveaux d'attaque assez faibles et similaires pour les deux années (**Tableau 5-1-5**). Le piétin verse n'atteint pas plus de 30% des bas de tige après le stade épi 1 cm et la rouille brune recouvre moins de 5% de la surface des feuilles tout au long de la culture. La septoriose, bien que toujours présente, n'affecte pas plus de 30% de la surface foliaire des trois dernières feuilles des plantes. Une importante gamme de variation des niveaux d'attaque de fusariose sur bas de tige et tige peut être notée (**Tableau 5-1-6**) à partir de la montaison (**Tableau 3-4**). Aucune relation ne semble lier ces deux types de maladies, ce qui suggère l'absence de migration des champignons dans la plante.

#### ***Caractérisation des composantes du rendement et de la teneur en protéines***

Le nombre de grains par m<sup>2</sup> des différentes parcelles présente une importante gamme de variation (de 1000 à 24000 grains/m<sup>2</sup>, **Tableau 5-1-7**). Le **Tableau 5-1-7** permet de constater que le nombre de

**Tableau 5-1-5 : Maladies ayant affecté les différentes parcelles agricoles biologiques**

Proportions de parcelles présentant ces proportions d'organes infectés	2001-02			2002-03				
	Epi 1cm	Floraison	35% Remplissage	Epi 1 cm	Floraison	20% Remplissage	70% Remplissage	
Piétin verse sur bas de tige	0-30%	88%	100%	100%	100%	92%	100%	
	30-60%	12%				8%		
Fusariose sur bas de tige	0-30%	94%	53%	88%	100%	62%	69%	100%
	30-60%	6%	41%	12%		31%	31%	
	60-100%		6%			8%		
Fusariose sur tige	0-30%	100%	94%	71%	100%	62%	38%	38%
	30-60%		6%	18%		31%	38%	15%
	60-100%			12%		8%	23%	46%
Septoriose sur les 3 dernières feuilles	0-15%	59%	94%	35%	100%	100%	100%	100%
	15-25%	35%		53%				
	25-35%	6%	6%	12%				

**Tableau 5-1-6 : Fréquences d'attaque par la fusariose sur bas de tiges et tiges**

Proportions d'organes infectés par la fusariose sur tige à la floraison	Proportions d'organes infectés par la fusariose sur bas de tige à la floraison		
	0-30%	30-60%	60-80%
0-30%	les 16 autres (9 <sup>1</sup> et 7 <sup>2</sup> )	AI <sup>1</sup> , AII <sup>1</sup> , AIII <sup>1</sup> , BII <sup>1</sup> , DI <sup>1</sup> , EII <sup>1</sup>	BIII <sup>1</sup>
30-60%	AIV <sup>2</sup>	DV <sup>2</sup> , EIII <sup>2</sup> , EIV <sup>2</sup>	DIV <sup>1</sup> , EVI <sup>2</sup>
60-70%		EV <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> parcelles de l'année 2001-02, <sup>2</sup> parcelles de l'année 2002-03

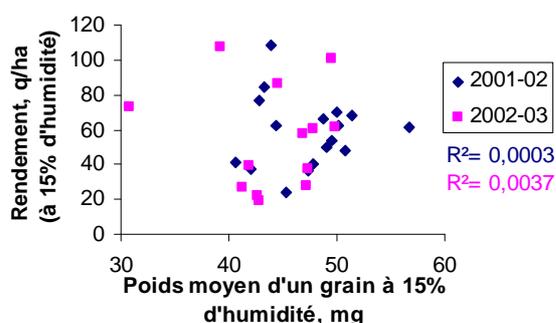
**Tableau 5-1-7 : Eléments pour un diagnostic sur les origines du nombre de grains par m<sup>2</sup>**

Matière sèche aérienne de blé à la floraison, g/m <sup>2</sup>	Indice de nutrition azotée à la floraison	1000-5000 grains par m <sup>2</sup>	5000-10000 grains par m <sup>2</sup>	10000-20000 grains par m <sup>2</sup>	20000-24000 grains par m <sup>2</sup>
0-500	<0,5	BI <sup>1</sup> , CI <sup>1</sup> , EI <sup>1</sup> , EVI <sup>2</sup>	BV <sup>2</sup> , BVI <sup>2</sup> , BVII <sup>2</sup> , BVIII <sup>2</sup>		
500-1000	<0,5	AIII <sup>1</sup> , BII <sup>1</sup> , BIV <sup>1</sup> , CII <sup>1</sup> , CIV <sup>1</sup>	AIV <sup>2</sup> , EII <sup>1</sup>	CVI <sup>2</sup>	
	0,5-0,9		EIV <sup>2</sup> , EV <sup>2</sup>		
1000-2000	<0,5	AI <sup>1</sup> , BIII <sup>1</sup> , CIII <sup>1</sup> , DI <sup>1</sup> , DII <sup>1</sup> , DIII <sup>1</sup>	DIV <sup>1</sup>		
	0,5-0,9	AII <sup>1</sup>		CV <sup>2</sup> , EIII <sup>2</sup>	
	0,9-1,1			DV <sup>2</sup>	DVI <sup>2</sup>

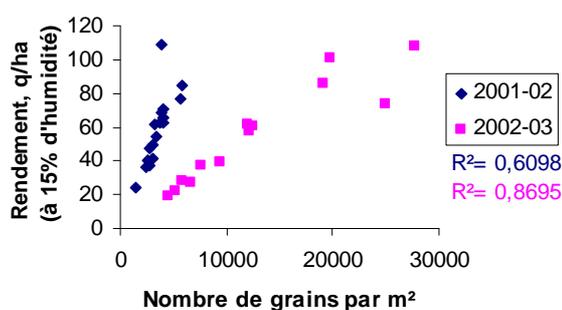
<sup>1</sup> parcelles de l'année 2001-02, <sup>2</sup> parcelles de l'année 2002-03

**Figure 5-1-2 : Relation entre le rendement et ses composantes**

(a)- Selon le poids moyen d'un grain



(b) Selon le nombre de grains par m<sup>2</sup>



grains par m<sup>2</sup> des cultures a été fortement limité par la faible nutrition azotée des plantes à la floraison et la faible quantité de biomasse des couverts (qui renseigne sur la biomasse des épis). Ces résultats sont conformes à ceux de littérature sur la formation du rendement (Coic, 1956 ; Masle-Meynard, 1980 ; Brooking and Kirby, 1981 ; Meynard, 1987 ; Gate, 1995 ; Jeuffroy and Bouchard, 1999). Au contraire, le poids moyen d'un grain observé sur les différentes parcelles est peu variable : à l'exception des parcelles BIV et DVI pour lesquelles le poids moyen d'un grain est respectivement de 57 mg et 30 mg (à 15% d'humidité), toutes les autres parcelles se caractérisent par des valeurs comprises entre 41 et 51 mg (**Figure 5-1-2a**). Sur nos parcelles agricoles biologiques, le nombre de grains par m<sup>2</sup> est le facteur déterminant dans l'établissement du rendement (**Figure 5-1-2**) : le coefficient de détermination entre ces deux variables est en effet supérieur à 0,6. Ce résultat est illustré dans le **Tableau 5-1-8** qui présente ces deux composantes et les rendements obtenus sur des parcelles voisines (même exploitation-année), dont les dates de semis et de floraison sont peu différentes (et les dates de méiose similaires puisqu'elles dépendent essentiellement de la température et de la photopériode -durée d'éclairement-) et où des variétés identiques ont été semées. Outre l'état nutritionnel du couvert et de sa densité, ces derniers éléments interviennent également sur la formation du rendement (Coic, 1956 ; Spiertz, 1977 ; Midmore *et al.*, 1984 ; Fischer, 1985 ; Meynard, 1987 ; Gate, 1995 ; Demotes-Mainard and Jeuffroy, 2001).

Par ailleurs, on peut remarquer que les gammes de variation des rendements (**Tableau 5-1-9**) sont très importantes en 2001-02 comme en 2002-03 (de 24 q/ha à 110 q/ha, à 15% d'humidité). A noter qu'en agriculture biologique en Ile-de-France, les rendements moyens sont de l'ordre de 45q/ha (à 15% d'humidité) : les rendements, dans l'ensemble, ne sont donc pas mauvais, et certaines parcelles présentent même des rendements excellents. La majorité des parcelles se caractérise par une faible teneur des grains en protéines, inférieure à 8% (**Tableau 5-1-9**). Ce constat est assez classique pour des parcelles agricoles biologiques, du fait de la faible nutrition azotée du couvert : en expérimentation en agriculture biologique, avec apports de différentes doses d'azote sous forme organique, les teneurs en protéines des grains varient de 9 à 11,7% (David, 2004).

*Pour résumer, les parcelles agricoles biologiques de notre réseau se caractérisent par d'importantes gammes de variation des états des peuplements sur lesquels va porter le diagnostic, tant en termes de composantes de structure (densité des blés comme des adventices) qu'en terme de nutrition, notamment azotée. Une confrontation de ces résultats obtenus en parcelles agricoles biologiques avec ceux des parcelles de l'essai conduites selon un mode conventionnel sera faite au cours de la troisième partie de ce chapitre.*

### **1.1.3- Caractérisation des niveaux d'attaque et de contamination des parcelles**

Les niveaux d'attaque par la fusariose sont assez semblables d'une année sur l'autre, et le plus souvent (mais pas toujours) relativement faibles, que ce soit du point de vue de l'intensité ou de la gravité de cette attaque : l'intensité d'attaque varie de 0 à 100% sur l'ensemble des parcelles, mais de 0 à 33% seulement sur l'ensemble des parcelles moins deux d'entre elles (DII et DIII) ; de même la gravité d'attaque varie de 0 à 45% sur l'ensemble des parcelles, mais seulement de 0 à 10% sur le même sous-ensemble (**Tableau 5-1-10**).

En ce qui concerne les mycotoxines susceptibles de contaminer les grains, deux seulement sont fréquemment détectées parmi toutes celles recherchées, à savoir : déoxynivalénol et nivalénol (**Tableau 5-1-10**). Ces mycotoxines sont d'ailleurs celles qui sont le plus couramment détectées en Europe (Bottalico, 1998). Les teneurs en nivalénol sont faibles : 87% des parcelles présentent des contaminations inférieures à la limite de quantification (60 µg/kg) ; deux parcelles, BIV et CIV, font exception en étant particulièrement contaminées, avec des teneurs respectives de 140 et 120 µg/kg. Les teneurs en déoxynivalénol sont également très faibles en 2001-02, où 75% des parcelles ne

**Tableau 5-1-8 : Contributions des différentes composantes du rendement à celui-ci, dans des parcelles géographiquement proches deux à deux**

Parcelles	Variété	Date de floraison	Poids moyen d'un grain à 15% d'humidité, mg	Nombre de grains / m <sup>2</sup>	Rendement à 15% d'humidité, q/ha	Teneur en protéines
CV	Aristos	03/06/03	50	19825	100	12%
CVI	Aristos	30/05/03	48	12432	60	8%
EV	Renan	27/05/03	47	12159	58	13%
EVI	Renan	27/05/03	42	4512	19	11%

**Tableau 5-1-9 : Principales caractéristiques des récoltes des parcelles du réseau**

Rendement à 15% d'humidité, q/ha	Nombre de grains par m <sup>2</sup>	Teneur en protéines des grains			
		6-8%	9-10%	11-12%	12-15%
5-25	1000-5000	BII <sup>1</sup>		EVI <sup>2</sup>	
	5000-10 000		AIV <sup>2</sup>		
25-45	1000-5000	BI <sup>1</sup> , CI <sup>1</sup> , CII <sup>1</sup>	EI <sup>1</sup>		
	5000-10 000	BV <sup>2</sup> , BVI <sup>2</sup>		BVII <sup>2</sup> , BVIII <sup>2</sup>	
45-75	1000-5000	AIII <sup>1</sup> , BIII <sup>1</sup> , BIV <sup>1</sup> , CIII <sup>1</sup> , CIV <sup>1</sup> , DIII <sup>1</sup>	AI <sup>1</sup> , DII <sup>1</sup>	AII <sup>1</sup>	
	5000-10 000			EIV <sup>2</sup>	EV <sup>2</sup>
	10 000-20 000	CVI <sup>2</sup>			
75-100	24 000-28 000				DVI <sup>2</sup>
	5000-10 000	DIV <sup>1</sup> , EI <sup>1</sup>			
	24 000-28 000			CV <sup>2</sup>	DV <sup>2</sup>
100-110	1000-5000	DI <sup>1</sup>			
	10 000-20 000			EIII <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> parcelles de l'année 2001-02, <sup>2</sup> parcelles de l'année 2002-03

présentent pas de niveaux de contamination supérieurs à la limite de quantification ; de nouveau, l'une des parcelles est cependant sévèrement contaminée en 2001-02, EI, qui présente un taux de 2250 µg/kg. En 2002-03 de 80% des parcelles présentent des niveaux de contamination dépassant le seuil de quantification et pouvant atteindre jusqu'à 850 µg/kg (mais sans dépasser les 1000 µg/kg de la future norme européenne).

**Malgré le climat plutôt élément** vis-à-vis des facteurs de risque décrits dans la littérature (pluviométrie à la floraison), **certaines parcelles** ont donc tout de même développé **d'importants niveaux d'attaque de fusariose** et ont présenté **des taux élevés de contamination en mycotoxines**. Cependant, nous avons déjà mentionné des données de la littérature indiquant des gammes de variation des intensités d'attaque allant de 60 à 80% (Dill-Macky and Jones, 2000) ou de 3 à 36% (Teich and Nelson, 1984), ou encore de 0 à 3% (Cromey *et al.*, 2002). Par ailleurs, les gammes de variation des teneurs en déoxynivalénol peuvent aller de 6500 à 15600 µg/kg (Dill-Macky and Jones, 2000) voire de 0 à 32500 µg/kg (Cromey *et al.*, 2002) selon les études. Il apparaît donc que par rapport à la littérature (et à la probable future norme européenne), **les parcelles que nous avons suivies se caractérisent par de relativement faibles niveaux de contamination**. Les différences de contamination entre les différentes parcelles sont cependant significatives (**Chapitre 4**). Mais même si les niveaux de contaminations sont significativement différents les uns des autres, les faibles gammes de variation ne vont pas faciliter la mise en évidence de relations avec les composantes du système de culture ou du climat, notamment pour le nivalénol qui est rarement quantifiable. Par ailleurs, le type de distribution que nous avons obtenu pour les symptômes comme pour la teneur en déoxynivalénol, avec quelques valeurs nettement supérieures à la plupart des autres, n'est pas du tout propice à un travail de diagnostic. Notre analyse "statistique" va s'en trouver sévèrement réduite.

On a vu au chapitre 3, et on retrouve dans le tableau **Tableau 5-1-10**, que le niveau d'attaque des épis par la fusariose avait été évalué selon deux indices différents, un indice d'"intensité" et un indice de "gravité". Le tableau montre que les deux indices sont globalement corrélés (mais pas parfaitement) : une faible (respectivement forte) intensité semble s'accompagner d'une faible (respectivement forte) gravité ( $R^2= 0,7535$  sur toutes les parcelles,  $R^2= 0,7866$  sans les parcelles AII et BII, et  $R^2= 0,6974$  sans les parcelles AII, BII, DII et DIII). Cependant, ces indices doivent être mesurés tous les deux pour rendre compte correctement de l'attaque de l'ensemble de la parcelle par la fusariose : en effet, une parcelle peut présenter beaucoup d'épis infectés mais des symptômes limités sur chaque épi, ce qui se traduit pas une intensité d'attaque élevée (comme pour BIV), ou encore des symptômes plus graves sur les épis attaqués mais moins fréquents sur la parcelle, ce qui se traduit pas une gravité d'attaque élevée (comme pour BII) Notons que nous n'avons observé aucune corrélation entre l'intensité ou la gravité de la fusariose de l'épi (à floraison ou en cours de remplissage) et l'intensité de la fusariose sur le reste de la plante, bas de tige ou tige, tout au long du cycle (données non montrées).

En ce qui concerne les toxines, il est à noter que, contrairement à Cromey *et al.* (2002), nous n'avons pas observé de corrélation significative entre les niveaux de déoxynivalénol et les niveaux de nivalénol : des parcelles présentant beaucoup de déoxynivalénol (comme EI) ne sont pas spécialement plus contaminées en nivalénol que les autres, et les parcelles présentant beaucoup de nivalénol ne sont pas toutes contaminées par déoxynivalénol (CIV). Le dosage du seul déoxynivalénol dans la majorité des études publiées ne permet pas de comparaison avec la littérature sur ce point.

Un autre fait se dégageant clairement du **Tableau 5-1-10** et de la **Figure 5-1-3** est que **les niveaux d'attaque par la maladie et de contamination par les mycotoxines ne semblent pas liés** (au moins dans les gammes de variation caractérisant cette étude) : certaines parcelles présentant beaucoup de symptômes, comme DII et DIII, ne sont pas contaminées en mycotoxines, et certaines parcelles fortement contaminées en toxines ne laissent voir que des symptômes faibles. Ce résultat est contraire

**Tableau 5-1-10 : Attaque des épis par la fusariose et contamination des grains en mycotoxines, sur les parcelles agricoles biologiques du réseau (2001-02 et 2002-03)**

Année	Parcelles	Intensité de fusariose	Gravité de fusariose	Déoxynivalénol, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Nivalénol, $\mu\text{g}/\text{kg}$	3-acétyldéoxynivalénol, $\mu\text{g}/\text{kg}$
2001-02	AI	0%	0%	180	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	AII	13%	7%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	AIII	17%	1%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BI	2%	0%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BII	13%	10%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BIII	17%	3%	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	BIV	23%	1%	60	140	<d <sub>l</sub>
	CI	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	CII	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	CIII	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	CIV	3%	0%	<d <sub>l</sub>	120	<d <sub>l</sub>
	DI	0%	0%	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	DII	100%	44%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	DIII	66%	15%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	DIV	20%	2%	60	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	EI	30%	5%	2250	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
	EII	0%	0%	190	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	2002-03	AIV	23%	2%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
BV		0%	0%	120	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
BVI		0%	0%	200	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
BVII		20%	1%	60	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
BVIII		33%	2%	70	80	<d <sub>l</sub>
CV		37%	3%	200	90	<d <sub>l</sub>
CVI		0%	0%	260	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
DV		17%	1%	180	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
DVI		3%	0%	210	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
EIII		0%	0%	270	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
EIV		20%	1%	850	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
EV		20%	2%	450	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
EVI	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	

<d<sub>l</sub> : teneur inférieure à la limite de détection (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), <q<sub>l</sub> : teneur inférieure à la limite de quantification (60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Les dosages de mycotoxines sont faits à la récolte tandis que les symptômes (intensité et gravité d'attaque) sont notés un peu avant (à 70% du remplissage des grains).

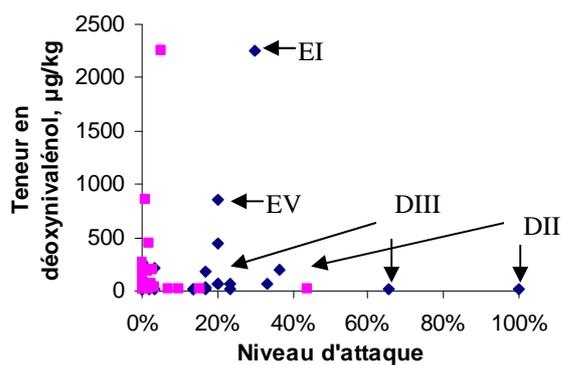
Toutes les parcelles commençant par la même lettre sont cultivées dans la même exploitation.

En bleu, les trois plus grandes valeurs des différentes colonnes pour chaque année.

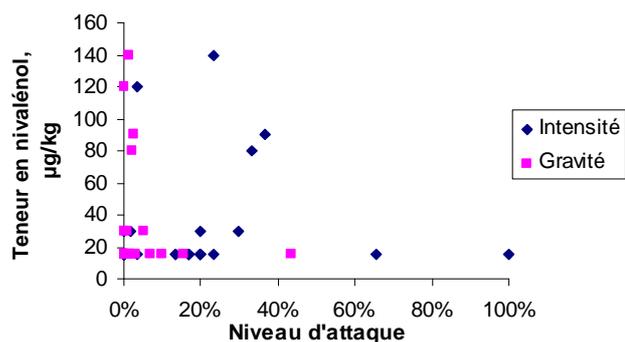
Les autres toxines fusariennes dosées (zéaralénone, néosolaniol, diacétoxyscirpénol, T2 toxine, monoacétoxyscirpénol, HT2 toxine, T2 triol, 15-acétyldéoxynivalénol et fusarénone X) sont indétectables dans nos échantillons.

**Figure 5-1-3 : Absence de corrélation entre contamination des grains en toxines et niveaux d'attaque des épis (intensité ou gravité) sur les parcelles du réseau**

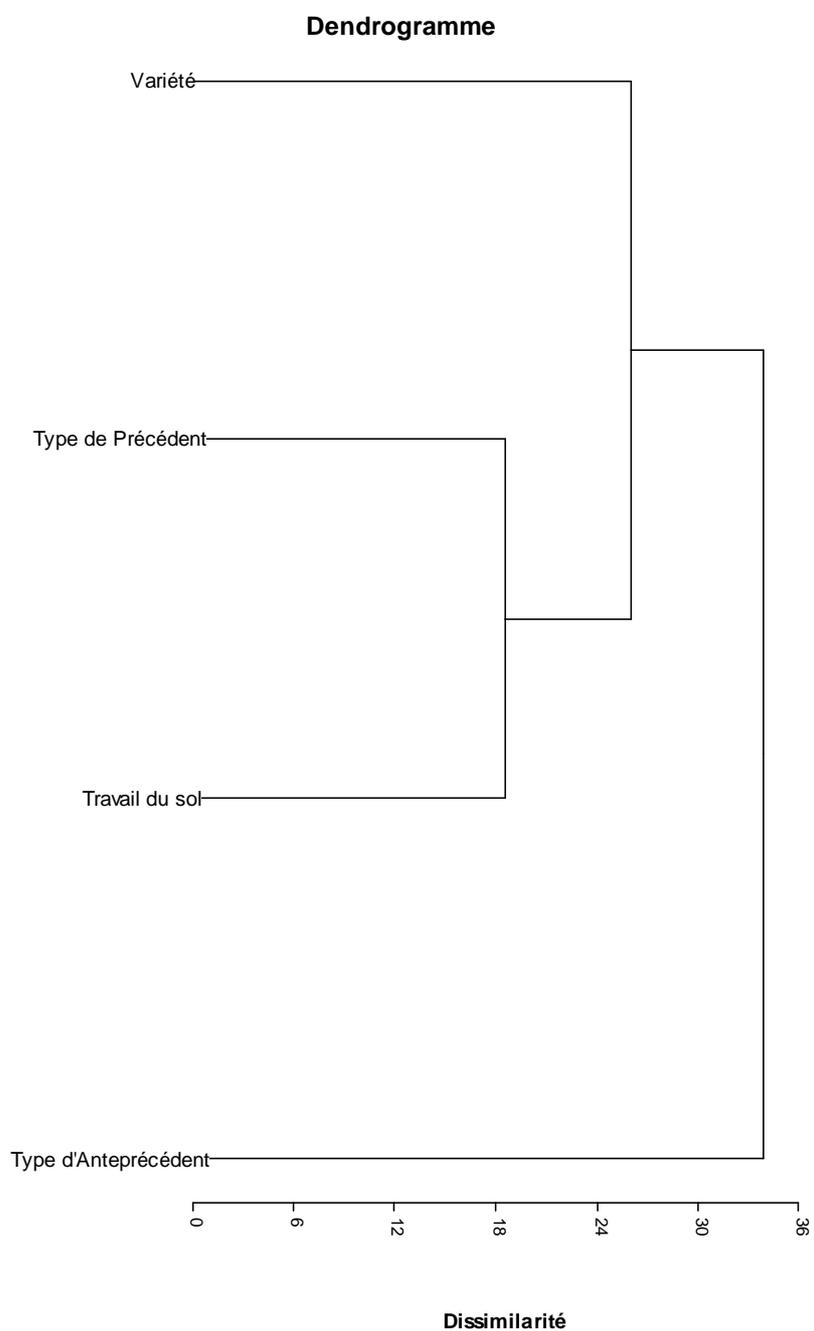
a- Contamination par déoxynivalénol



b- Contamination par nivalénol



**Figure 5-1-4 : Classification ascendante hiérarchique de quatre pratiques culturelles sur l'ensemble des parcelles du réseau**



Les différentes variables qualitatives sont codées de telle sorte que le risque le plus grand (selon la littérature) soit associé au code le plus fort (**Chapitre 3**).

à ceux de différentes études, où une corrélation significative et positive entre la contamination par le déoxynivalénol et l'intensité et/ou la gravité de la maladie a été obtenue (Teich and Hamilton, 1985 ; Teich *et al.*, 1987 ; Teich, 1989 ; Snijders, 1990b ; Snijders and Perkowski, 1990e ; Dill-Macky and Jones, 2000 ; Homdork *et al.*, 2000 ; Hestbjerg *et al.*, 2002). Par contre, il est conforme aux résultats acquis par d'autres auteurs (Fourbet *et al.*, 2001 ; Birzele *et al.*, 2002 ; Magan *et al.*, 2002), et implique qu'aucune estimation précoce de la production de mycotoxines ne peut être faite par une simple (et peu coûteuse) évaluation des symptômes de la fusariose : dans l'état actuel des connaissances, pour estimer la production en mycotoxines, un dosage des mycotoxines est systématiquement nécessaire.

## 1.2- Association des pratiques agricoles sur le réseau

Sur l'ensemble des 30 parcelles agricoles que nous avons suivies, nous avons comparé les itinéraires techniques correspondant aux différentes parcelles (travail du sol, précédent cultural et variété) et susceptibles, d'après la littérature, d'avoir influencé le développement de la fusariose de l'épi et la production de déoxynivalénol. Le dendrogramme représenté sur la **Figure 5-1-4** indique que les pratiques agricoles des agriculteurs sur leurs champs ont été fortement liées entre elles (les "indices de dissimilarité" sont assez faibles). Le type de précédent cultural et le travail du sol sont les plus fortement agrégés, puis ce couple de pratiques est lié à la variété et enfin aux types d'antéprécédent cultural (c'est-à-dire que derrière une culture donnée, les agriculteurs ont fait dans beaucoup de cas le même choix de labourer ou pas, puis, avec toutefois moins de probabilité, de planter la même variété, le type d'antéprécédent ayant été plus diversifié). **La forte association des pratiques effectives qui ressort de cette figure entraîne un risque de "confusion" d'effets** dans nos analyses à venir des niveaux d'attaque ou de contamination. Une étude par couple de parcelles ne présentant que peu de pratiques culturelles différentes sera donc entreprise.

A noter que l'agrégation du travail du sol au précédent cultural est légèrement biaisée par le petit nombre de parcelles ne présentant pas de travail du sol, par rapport à celles qui en présentent un. En absence de la variable "travail du sol", les différentes liaisons ne changent cependant pas : une classification similaire est obtenue.

## 1.3- Effets du milieu et des pratiques culturelles

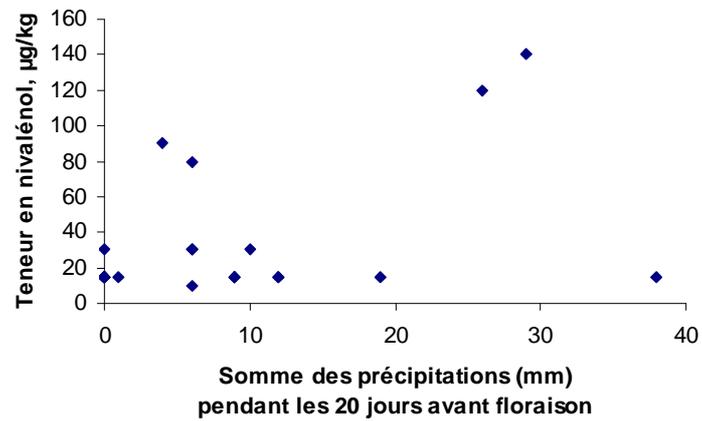
### 1.3.1- Effets environnementaux

#### *Précédents modèles de prévision des attaques ou des contaminations*

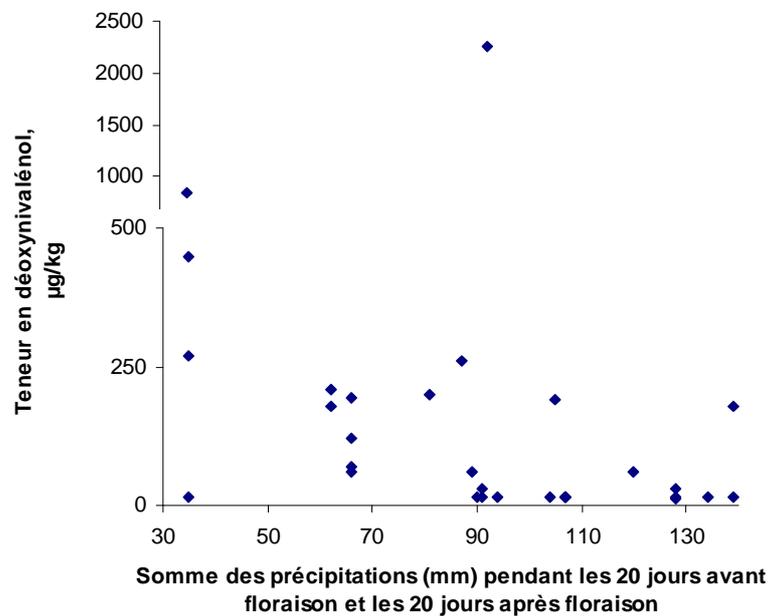
La littérature contient quelques modèles permettant de prédire, à partir de données recueillies plus tôt dans l'année, la quantité de déoxynivalénol qui sera présente dans les grains à la récolte (Hooker *et al.*, 2002 ; De Wolf *et al.*, 2003 ; Detrixhe *et al.*, 2003).

Hooker *et al.* (2002) identifient ainsi au Canada trois périodes critiques autour de l'épiaison : (i) de 4 à 7 jours avant l'épiaison, période où la contamination par le déoxynivalénol augmenterait avec le nombre de jours de pluie de plus de 5 mm/jour et diminuerait avec le nombre de jours où la température minimale est inférieure à 10°C ; (ii) de 3 à 6 jours après l'épiaison, période où la contamination par le déoxynivalénol augmenterait avec le nombre de jours de pluie de plus de 3 mm/jour et diminuerait avec le nombre de jours où la température maximale est supérieure à 32°C ; et (iii) enfin de 7 à 10 jours après l'épiaison, période où la contamination par le déoxynivalénol augmenterait avec le nombre de jours de pluie de plus de 3 mm/jour. Ce modèle, récemment affiné (Hooker and Schaafsma, 2003), ne peut cependant pas nous être utile dans la mesure où la période critique identifiée y est l'épiaison, et qu'en France les températures ne sont jamais (ou que très rarement) supérieures à 32°C à cette époque de l'année (fin mai). De plus, il est basé sur une gamme de contaminations en déoxynivalénol allant de moins de 1000 à plus de 5000 µg/kg, alors que les niveaux de contaminations que nous avons rencontrés ne dépassent guère 850 µg/kg (parcelle EI exceptée).

**Figure 5-1-5: Influence des précipitations autour de la floraison sur les niveaux de contamination par les mycotoxines**  
a- Nivalénol



b- Déoxynivalénol



Un autre modèle, établi en 2003 en Belgique (Detrixhe *et al.*, 2003) (modèle réalisé à partir de 43 observations d'infection, avec 21 % de probabilité de fausse détection), estime le risque d'avoir plus de 10% des grains infectés par les *Fusarium*. Il est basé sur l'évaluation, entre le 8<sup>ème</sup> jour précédant la floraison et le 7<sup>ème</sup> jour la suivant, d'une combinaison de la température (inférieure ou supérieure à 12°C) et de la durée d'humidité des feuilles. Bien que nous ne connaissions pas le modèle au début de cette thèse, nous avons commencé à faire des mesures microclimatiques (durée d'humectation et température, à différents niveaux du couvert) dans une parcelle d'essai (BI), avec notamment l'intention de tester l'idée d'un éventuel effet de la densité de semis et des adventices sur l'humidité des feuilles. Cependant, nous n'avons pas pu exploiter ces résultats en raison de pannes à répétition de l'instrument de mesure de l'humidité, et nous n'avons donc en particulier pas pu confirmer ni infirmer ce modèle.

Le dernier modèle (à notre connaissance) existant dans la littérature (De Wolf *et al.*, 2003) estime lui aussi le risque d'avoir plus (ou moins) de 10% de gravité d'attaque de fusariose sur les épis (modèle réalisé à partir de 18 parcelles présentant une gravité d'attaque de plus de 10%, et 32 parcelles présentant une gravité d'attaque de moins de 10%). Il est basé sur des variables climatiques relevées entre 7 jours avant l'anthèse (floraison) et 10 jours après. Trois variables sont considérées comme discriminantes : le nombre d'heures pendant lesquelles il a plu de 7 jours avant l'anthèse jusqu'à l'anthèse, le nombre d'heures pendant lesquelles la température a été comprise entre 15 et 30°C sur la même période, et le nombre d'heures pendant lesquelles la température a été comprise entre 15 et 30°C et l'humidité relative a été supérieure ou égale à 90% pendant les 10 jours qui suivent la date de floraison. Ce modèle ayant été publié en 2003, nous n'avons pas pu organiser une acquisition de mesures heure par heure pour le tester : nous ne disposons que de données quotidiennes. Cependant, ce modèle est focalisé sur la période de floraison, alors que nous avons vu dans le chapitre 4 que dans notre cas, la floraison ne semble pas être une période critique.

Néanmoins, la littérature soulignant unanimement l'importance de la pluviométrie autour de la floraison sur les attaques de fusariose, nous avons nous aussi cherché à évaluer le rôle de la pluviométrie.

#### ***Importance de l'effet de la pluviométrie à la floraison***

Nous nous sommes intéressés à la somme des précipitations sur une période de plus ou moins 20 jours autour de la date de floraison, en tentant huit modes d'agrégation différents : les 10 jours avant la floraison, les 20 jours avant la floraison, les 10 jours après la floraison, les 20 jours après la floraison, la période de 10 jours avant à 10 jours après la floraison, celle de 20 jours avant à 20 jours après, celle de 20 jours avant et 10 après et enfin celle de 10 jours avant et 20 jours après la floraison. Les précipitations sur les 20 jours précédant la floraison semblent positivement influencer la contamination en nivalénol (**Figure 5-1-5a**), mais les niveaux de nivalénol sont sans doute trop bas pour que la chose soit très fiable, et de plus seules quatre parcelles présentent un niveau de nivalénol quantifiable. La corrélation n'est pas meilleure pour la contamination en déoxynivalénol (**Figure 5-1-5b**). Sur l'ensemble des parcelles, la disproportion du niveau de contamination en déoxynivalénol de la parcelle EI (avec 2250 µg/kg) par rapport à celui des autres parcelles ruine toute tentative de corrélation ; après élimination de cette parcelle, la somme des précipitations sur la période des 20 jours avant et après la floraison semble présenter un léger effet (négatif) sur la contamination en déoxynivalénol. Néanmoins, à l'évidence, les corrélations (si elles existent) sont faibles pour les deux toxines. Le même travail réalisé sur la moyenne des humidités maximales sur les parcelles ne donne aucun effet significatif. Par ailleurs, aucune de ces 8 périodes de pluviométrie ou d'humidité n'influe significativement sur les niveaux d'attaque par la maladie (exprimée en terme d'intensité comme de gravité, avec ou sans les parcelles à forts niveaux d'attaque DII et DIII), ce qui est particulièrement étonnant si la pluviométrie facilite la dispersion et si l'humidité favorise l'infection des grains. Sur les parcelles que nous avons suivies, **les précipitations autour de la période de floraison ne semblent donc pas avoir été un**

**Tableau 5-1-11 : Résultats des régressions linéaires multiples entre les variables et périodes climatiques d'influence d'une part et les attaques ou les contaminations d'autre part, dans les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)**

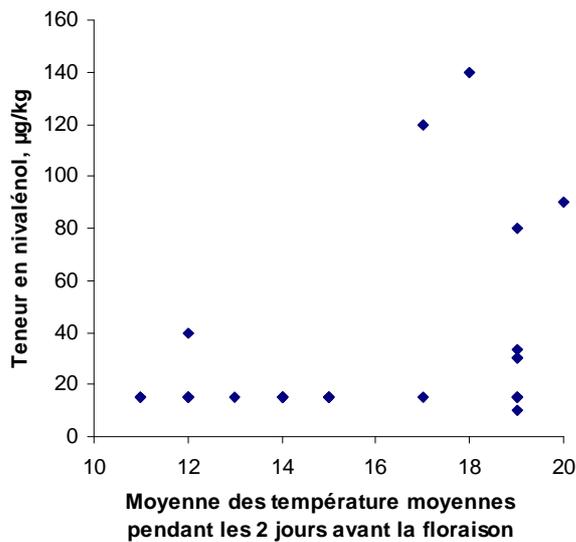
	Variables explicatives	Période de	R <sup>2</sup> et $\alpha$ du modèle <sup>a</sup>
<b>Intensité</b>			
Toutes données	Somme des précipitations (mm)	-10 j à la récolte	0,30 ***
	Somme des précipitations (mm)	-9 j à la récolte	
Sans DII, DIII	Moyenne des températures moyennes (°C)	-2 j à la floraison	0,32 **
	Somme des précipitations (mm)	-9 j à la récolte	
<b>Gravité</b>			
Toutes données	Moyenne des températures moyennes (°C)	floraison à 6j	0,52 ****
	Moyenne des températures moyennes (°C)	floraison à 7j	
	Somme des précipitations (mm)	-10 j à la récolte	
Sans DII, DIII	Moyennes des humidités maximales (%)	semis à la récolte	0,39 ***
	Somme des précipitations (mm)	-6 j à la floraison	
	Somme des températures moyennes (°C) <sup>b</sup>	Octobre à février	
<b>Déoxynivaléno</b>			
Toutes données	Moyenne des températures moyennes (°C)	-8 j à la récolte	0,58 ****
	Moyenne des températures moyennes (°C)	-2 j à la floraison	
	Moyenne des températures moyennes (°C)	-9 j à la récolte	
Sans EI	Somme des précipitations (mm)	-28 j à la récolte	0,44 ****
<b>Nivaléno</b>			
Toutes données	Moyenne des températures moyennes (°C)	-2 j à la floraison	0,44 ***
	Somme des précipitations (mm)	-10 j à la floraison	
	Somme des précipitations (mm)	-5 j à la récolte	

<sup>a</sup> Le modèle renseigné considère les deux ou trois variables explicatives retenues par "l'optimisation" de la régression linéaire multiple par l'option Stepwise du logiciel SAS. <sup>b</sup> Variable explicative sans effet direct à  $\alpha = 5\%$ , toutes les autres ont un effet direct à ce seuil.

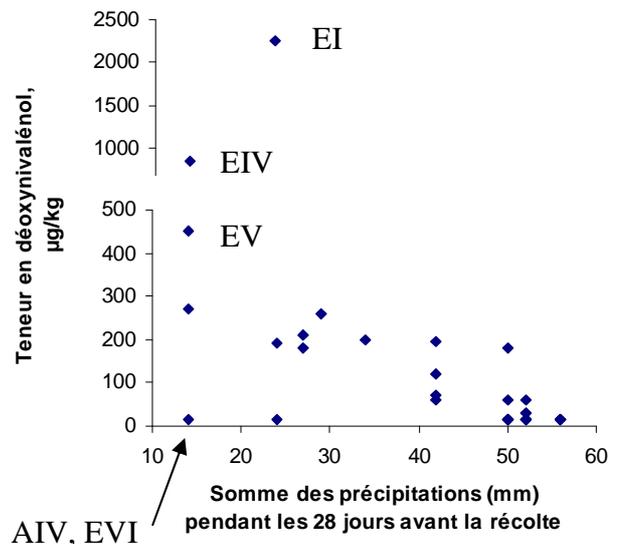
\*\*  $\alpha < 0,05$  ; \*\*\*  $\alpha < 0,01$  ; \*\*\*\*  $\alpha < 0,001$

**Figure 5-1-6 : Relation entre les niveaux de contamination et les principales variables climatiques à effet direct**

a- Pour la contamination en nivaléno



b- Pour la contamination en déoxynivaléno



**facteur particulièrement important pour contrôler les niveaux d'attaque ou de contamination.**

Ce résultat peut être interprété de deux manières, non exclusives. La première se réfère à l'hypothèse émise au paragraphe 4-2, selon laquelle la production des toxines sur notre réseau est liée à une contamination survenue après la floraison, comme nous l'avons déjà supposé pour 2001-02. La seconde consiste tout simplement à constater que si certaines relations entre variables climatiques et développement du pathogène peuvent être établies en conditions contrôlées et pour des gammes de variation importantes des conditions climatiques, leur transposition en parcelles agricoles, où les conditions peuvent être bien différentes de celles dans lesquelles ces modèles ont été établis, n'est pas garantie.

**Identification des facteurs climatiques d'importance sur nos parcelles agricoles**

A partir de nos données, nous avons alors cherché lesquelles des variables climatiques, à quels stades et sur quelles durées, étaient les mieux corrélées (par des corrélations linéaires, testées selon la procédure Stepwise du logiciel SAS) aux symptômes de fusariose sur épi (intensité et gravité) et à la contamination des grains par les mycotoxines (déoxynivalénol et nivalénol). Plusieurs périodes climatiques ont été prospectées : d'octobre à février, de mars à juillet, du semis à la récolte, de la floraison à la récolte, plus ou moins 20 jours autour de floraison (période qui couvre celle prospectée par les trois précédents modèles) et enfin 30 jours avant la récolte (période couvrant quasiment la totalité de la période de remplissage et qui recouvre en partie la période précédente). Les variables climatiques testées sont le cumul des précipitations ou des températures moyennes journalières, la moyenne des températures moyennes journalières, la moyenne des humidités maximales ou moyennes journalières, et la moyenne du rayonnement quotidien. Parmi toutes ces variables et toutes les périodes testées, les combinaisons de variables et périodes qui ont été retenues par l'analyse (qui considère successivement toutes les parcelles, puis toutes sauf les quelques parcelles susceptibles de biaiser les résultats, DII et DIII lors de l'étude sur les niveaux d'attaque, et EI lors de l'étude sur les contaminations en déoxynivalénol) sont présentées dans le **Tableau 5-1-11**. L'utilisation d'une même variable explicative sur deux périodes très proches est étonnante. Néanmoins, on s'aperçoit que ces "variables redondantes" n'apparaissent que dans les modèles concernant l'ensemble des parcelles. En absence des parcelles extrêmes (DII, DIII et EI), ces "variables redondantes" disparaissent. Ce constat permet d'imaginer que l'une de ces deux variables a été importante pour les parcelles "extrêmes" (DII, DIII ou EI) tandis que l'autre est importante pour les autres parcelles.

Le **Tableau 5-1-11** montre, conformément à ce qui est décrit dans la littérature, que le climat intervient bien dans la détermination des niveaux d'attaque et/ou de contamination : les probabilités pour que les variables explicatives sélectionnées interviennent dans la détermination des niveaux d'attaque et/ou de contamination sont très grandes (les risques d'erreur  $\alpha$  sont très faibles). Néanmoins, les coefficients de détermination ( $R^2$ ) des relations obtenues sont relativement faibles (les points sont très dispersés autour du modèle, notamment en raison du faible jeu de données et des gammes de variations d'attaque et de contamination peu étendues). Dans le cas des niveaux d'attaque, ces coefficients de détermination sont même généralement inférieurs à 0,40, ce qui limite la signification concrète de telles relations. Dans le cas des niveaux de contamination par les mycotoxines, les coefficients de détermination sont un peu plus élevés, tout en restant limités à environ 0,45 en absence de la parcelle extrême EI. Les niveaux de nivalénol, quand ils sont quantifiables (quatre parcelles), semblent augmenter avec la température (**Figure 5-1-6a**) et la pluviométrie (données non montrées). En revanche, et contrairement à la littérature (qui propose un sens de variation différent et une période critique différente), plus il pleut durant les 28 jours qui précèdent la récolte (c'est-à-dire à la fin du remplissage des grains), plus la teneur en déoxynivalénol dans les grains est faible (**Figure 5-1-6b**). Seules trois parcelles ne suivent pas cette relation : la parcelle EI, et deux parcelles non contaminées en 2002-03, à savoir AIV et EVI. En absence de ces trois parcelles, le coefficient de détermination de la relation entre la pluviométrie sur les 28 derniers jours du remplissage et la teneur en déoxynivalénol

**Tableau 5-1-12 : Niveaux d'attaque et de contamination du blé et compositions chimiques du sol dans les parcelles du réseau, classés par types de sol**

Types de sol	Nombre de parcelles	Intensité		Gravité		Déoxynivalénol µg/kg	Nivalénol µg/kg	Carbone / Azote total	Azote total / Potassium	Matière organique, g/kg
Argilo-Calcaire	1 : DVI	3%		0%		210	<d <sub>l</sub>	10,0	1,8	43,21
Argilo-limoneux	17	19%	±27%	5%	±11%	110 ± 120	<q <sub>l</sub>	9,5	5,3	24,13
Limoneux	9	16%	±13%	2%	±2%	400 ± 750	<q <sub>l</sub>	10,2	4,1	18,07
Sableux	3 : CI, CII, EVI	0%	±0%	0%	±0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	17,3	4,0	27,42

**Tableau 5-1-13 : Types de sol, attaques, contaminations et compositions chimiques du sol dans trois parcelles particulières du réseau**

Parcelle	Texture	Sable	Intensité	Gravité	Déoxynivalénol, µg/kg	Carbone / Azote total	Azote total / Potassium	Matière organique, g/kg
EIV	Limoneux	12%	20%	1%	850	10	4,9	15,69
EV	Argilo-limoneux	21%	20%	2%	450	10	5,0	16,96
EVI	Sableux	85%	0%	0%	<d <sub>l</sub>	12	4,2	8,00

La couleur verte caractérise les parcelles de sols sableux ou calcaire.

est de 0,683.

Pour conclure cette analyse des effets climatiques, il nous semble important de relever deux points. Le premier est la fragilité, quand on se situe en conditions agricoles réelles, des corrélations entre les caractéristiques climatiques et le développement des symptômes ou la production de toxines. Ce point nous paraît important, et s'oppose au fort sentiment, dans les milieux agricoles et chez ceux qui s'intéressent à la fusariose, que ce sont les conditions climatiques au moment de la floraison qui déterminent principalement les niveaux de contamination. Il ne s'agit pas pour nous de nier un rôle du climat, qui bien évidemment doit exister, mais simplement de souligner que d'une part nous n'en avons pas une connaissance suffisante pour qu'elle soit utilisée de manière prévisionnelle, et que d'autre part la période de "sensibilité climatique" n'est probablement pas limitée à celle de la floraison. Une autre étude toute récente (Monaghan *et al.*, 2004) suggère d'ailleurs également que les déterminants climatiques du niveau d'attaque sont plus complexes qu'on ne le dit d'habitude : ce niveau serait lié à la fois à la température, à l'humidité relative et à l'humidité des feuilles de la mi-anthèse à la récolte, alors que les niveaux de contamination seraient, eux, liés à la pluviométrie sur cette même période. Le second point important à souligner est que cette fragilité des corrélations renforce l'hypothèse principale sur laquelle est basée notre démarche de diagnostic, à savoir que le facteur climatique n'agit pas seul, mais en interaction avec les systèmes de culture pratiqués, ce que nous allons précisément chercher à mettre en évidence. Dès lors, l'absence d'effets très clairs du climat ne nous surprend guère.

#### ***Analyse d'un éventuel effet de la nature du sol (effet édaphique)***

Le **Tableau 5-1-12** décrit les niveaux d'attaque et de contamination mesurés pour les parcelles du réseau, regroupées selon la nature de leur sol. La parcelle DVI, qui a un sol de type argilo-calcaire, et les trois parcelles CI, CII et EVI, qui ont un sol de type sableux (teneurs en sable respectives : 79%, 65% et 85%), ont été pas ou peu attaquées par rapport aux autres parcelles, et pas ou relativement peu contaminées par des toxines (**Tableau 5-1-12**). Il semble donc que le type de sol puisse influencer sur les niveaux d'attaque et de contamination.

Bien que le faible nombre de nos parcelles ne permette pas de conclure définitivement sur cette question (d'autant plus qu'il est peu probable que la texture du sol agisse seule), deux hypothèses peuvent être formulées, sur la base de nos connaissances sur l'épidémiologie du champignon, pour expliquer ce résultat : (i) les sols sableux seraient plus pauvres en matière organique, ce qui influencerait la conservation des champignons d'une année sur l'autre, et (ii) les sols sableux n'auraient pas la même alimentation minérale en azote, phosphore et/ou potassium (Onuorah, 1969) et en silicium (Trolldenier, 1969 ; Rodgers-Gray and Shaw, 2000), ce qui affecterait le développement des champignons. Pour tenter d'isoler l'effet du type de sol, nous avons considéré particulièrement trois parcelles de l'exploitation E en 2002-03 (EIV, EV, EVI), où la même variété a été semée le même jour, selon une même densité, derrière une même culture et avec un même travail du sol (**Tableau 5-1-13**). On constate que le sol de la parcelle sableuse (EVI) contient effectivement moins de phosphore, de potassium, de silicium (**Annexe 2**), de matière organique, et légèrement moins d'azote (puisque C/N est plus grand) que les deux autres parcelles. Les deux hypothèses énoncées sont donc possibles, et d'autres analyses, sur d'autres parcelles, sont nécessaires pour déterminer si une des deux hypothèses a plus d'influence que l'autre. Ce résultat est néanmoins cohérent avec d'autres publications indiquant qu'un excès de potassium, surtout en présence d'une carence azotée, augmente la résistance des plantes à la fusariose (Trolldenier, 1969 ; Cassini, 1970).

Une troisième hypothèse peut être formulée pour expliquer un effet du type de sol : le type de sol modulerait l'effet de la pluviométrie. Une analyse de variance permet en effet de détecter une interaction entre le type de sol et la somme des précipitations pendant les 28 derniers jours du



remplissage pour contrôler la teneur en déoxynivalénol ( $R^2= 0,4458$  et  $\alpha < 0,01$ , si on ne prend pas la parcelle EI) : sur l'ensemble des types de sol, s'il pleut d'avantage il y a moins de déoxynivalénol produit, mais c'est d'autant plus vrai si le sol contient davantage d'argile, qui probablement retient l'eau. Tout semble donc se passer comme si (i) en sol sableux, le ruissellement est tel que l'humidité du sol nécessaire à la survie des champignons n'est pas assurée (d'où de plus faibles niveaux d'attaque, mais que simultanément (ii) quand le développement du champignon sur l'épi est assuré par une humidité minimale, le champignon produit moins de déoxynivalénol. Le sol, par l'intermédiaire d'une modification des conditions de survie des champignons, pourrait donc bien être un déterminant important de la production de mycotoxines. *On retrouve ici toute l'ambiguïté liée au fait que les mycotoxines sont produites par des champignons en état de stress : si les conditions sont telles que les champignons pathogènes n'arrivent pas à pousser, on ne trouvera bien sûr pas beaucoup de mycotoxines ; et si les conditions sont idéales pour la croissance, on trouvera beaucoup de pathogènes, mais qui ne libéreront pourtant pas beaucoup de toxines.*

### **1.3.2- Effets des pratiques culturales**

#### **Effets du travail du sol**

La littérature suggère que l'absence de travail du sol constitue la première pratique "à risque", favorisant le développement de la fusariose et la production de toxines associées (**Chapitre 1**). Les parcelles suivies dans le réseau sont des parcelles cultivées en agriculture biologique, et dans ce système le labour occupe une place importante, notamment dans la gestion des adventices. Ne pas labourer ne serait pas une pratique culturale cohérente dans ce type de système de culture ; aussi, dans notre population de parcelles, seules deux parcelles BII et BVI ne sont pas labourées. Pourtant, le **Tableau 5-1-10** montre que la parcelle BII n'a pas de contamination détectable en mycotoxines, et a des niveaux d'attaque moyens. La parcelle BVI, elle, n'a pas de symptômes de fusariose détectables ; elle a une très faible contamination en nivalénol (inférieure à la limite de quantification) et une contamination en déoxynivalénol moyenne, de 200 $\mu$ g/kg.

Par comparaison de la parcelle BVI avec la parcelle BV, labourée, elle, et semée en même temps que BVI et avec la même variété et la même densité de semis, on constate de nouveau, mais cette fois à l'intérieur d'un même exploitation, que l'absence de labour n'a pas eu d'effet sur l'expression de la maladie (symptômes visibles) ; cette pratique a néanmoins très légèrement favorisé la production de toxines, puisque la parcelle BV ne présente que 120  $\mu$ g/kg de déoxynivalénol (et un nivalénol indétectable) : pour ce qui concerne les toxines, les résultats sont donc cohérents avec ceux obtenus dans la littérature, mais ce n'est pas le cas pour ce qui concerne les niveaux d'attaque.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant aux mécanismes à l'origine de l'effet supposé du labour sur la contamination en toxines. Il a été suggéré (Rodgers-Gray and Shaw, 2000) que la décomposition des résidus enfouis pourrait augmenter le silicium dans le sol puis dans les plantes, favorisant leur résistance en fortifiant les parois cellulaires et surtout la membrane externe des cellules épidermiques (Trolldenier, 1969). Nos mesures de densités de résidus montrent que la parcelle BVI (non labourée) présente effectivement davantage de résidus (près de 10 fois plus) que la parcelle BV (labourée), mais dans le sol, à la sortie de l'hiver, l'annexe 2 montre que les deux parcelles présentent le même taux de silicium (0,11 g/kg). Ces résultats semblent donc contredire cette hypothèse. Une autre hypothèse serait qu'en cas de non-labour, le surplus de résidus pourrait servir de support de survie aux champignons, favorisant ainsi l'infection ultérieure des plants de blé. Des analyses qualitatives et quantitatives de la flore présente sur les résidus (pour détecter la présence de champignons) pourraient aider à confirmer cette hypothèse.

**Tableau 5-1-14 : Niveaux d'attaque et de contamination selon le type de précédent cultural sur les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)**

Type de précédent	Nombre de parcelles	Intensité moyenne	Gravité moyenne	Déoxynivalénol moyen µg/kg	Nivalénol moyen µg/kg
Céréale	3	18% ±4%	4% ±5%	<q <sub>l</sub> <sup>b</sup>	<d <sub>l</sub> <sup>a</sup>
Autre	22	18% ±25%	4% ±10%	140 ±200	<d <sub>l</sub> <sup>a</sup>
Autre sans DII, DIII	20	11% ±12%	1% ±2%		
Maïs	5			520 ±970	<q <sub>l</sub> <sup>b</sup>
Maïs sans EI	4	7% ±13%	1% ±2%	90 ±100	

**Tableau 5-1-15 : Attaque des épis selon l'histoire culturelle sur les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)**

Type de précédent	Nombre de parcelles			Intensité d'attaque						Gravité d'attaque					
	Type d'antéprécédent			Moyenne et écart type						Moyenne et écart type					
	Céréale	Autre	Maïs	Céréale	Autre	Maïs	Céréale	Autre	Maïs	Céréale	Autre	Maïs			
Céréale	2	1		17% ±5%	20% nd		6% ±6%	2% nd							
Autre	5	14	3	29% ±41%	15% ±20%	10% ±9%	9% ±19%	2% ±4%	3% ±4%						
Autre sans DII, DIII	4	13		11% ±11%	12% ±1%		1% ±1%	1% ±1%							
Maïs	3	2		10% ±17%	3% ±1%		2% ±3%	0% ±0%							

**Tableau 5-1-16 : Contamination des grains selon l'histoire culturelle sur les parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)**

Type de précédent	Nombre de parcelles			Déoxynivalénol, µg/kg						Nivalénol, µg/kg					
	Type d'antéprécédent			Moyenne et écart type						Moyenne et écart type					
	Céréale	Autre	Maïs	Céréale	Autre	Maïs	Céréale	Autre	Maïs	Céréale	Autre	Maïs			
Céréale	2	1		<q <sub>l</sub> <sup>b</sup>	60 nd		<d <sub>l</sub> <sup>a</sup>	<d <sub>l</sub> <sup>b</sup>							
Autre	5	14	3	130 ±120	150 ±240	60 ±100	<d <sub>l</sub> <sup>a</sup>	<d <sub>l</sub> <sup>b</sup>	<d <sub>l</sub> <sup>b</sup>						
Maïs	3	2		860 ±1200	<d <sub>l</sub> <sup>a</sup>		<d <sub>l</sub> <sup>a</sup>	80 ±60							
Maïs sans EI	2	2		170 ±<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub> <sup>a</sup>										

< d<sub>l</sub> teneur en toxine inférieure à la limite de détection (30 µg/kg), < q<sub>l</sub> teneur en toxine inférieure à la limite de quantification (60 µg/kg). Sont présentés les moyennes et les écarts-types, nd écart type non déterminé.

<sup>a</sup> l'écart type calculé est inférieur à la limite de détection, <sup>b</sup> l'écart type calculé est inférieur à la limite de quantification.

En bleu les situations de plus fortes attaques et/ou contamination, en vert les plus faibles.

### **Effets du précédent cultural**

La littérature suggère que le choix du précédent cultural est la seconde pratique à risque vis-à-vis de la fusariose et des mycotoxines associées. L'agriculture biologique est contrainte de faire des rotations de cultures diversifiées afin, entre autres, de limiter au maximum les attaques de pathogènes. Parmi les nombreux précédents culturaux observés sur les différentes parcelles de notre étude (**Tableau 3-1**), cinq sont des cultures de maïs (BI, CIV, EI en 2001-02 et BV, BVI en 2002-03), trois sont des cultures de triticale, seule ou en mélange fourrager (nous les appellerons "type céréale" : BII, DIV, BVII), tandis que les autres sont des légumineuses, légumes ou prairies (nous les appellerons "type autre"). Sur l'ensemble du réseau (**Tableau 5-1-14**), on constate que les parcelles de blé cultivées à la suite d'une culture de maïs sont moins attaquées (en intensité et en gravité) que les autres. En revanche, elles sont plus contaminées par les mycotoxines (nivalénol et déoxynivalénol). Cependant, la contamination par déoxynivalénol sur ces parcelles est essentiellement liée à la parcelle EI : sans cette parcelle beaucoup plus fortement contaminée que les autres, ce sont les blés faisant suite à d'autres cultures, et notamment trèfle (en moyenne 240 µg/kg) et haricots verts (en moyenne 260 µg/kg), qui sont les plus contaminées par déoxynivalénol. Le type de précédent cultural "céréale" est, quant à lui, associé à des parcelles faiblement contaminées mais tout de même plus fortement attaquées que pour les autres types de précédent.

Si l'on s'intéresse maintenant au couple des cultures précédente et antéprécédente (à l'"histoire culturale"), les attaques les plus importantes sont notées sur les parcelles de blé cultivées à la suite de cultures de type "céréale" suivant elles-mêmes des cultures de type "autre" ou "céréale" (**Tableau 5-1-15**). Les plus importantes contaminations en déoxynivalénol correspondent aux cultures de blé suivant une culture de maïs elle-même cultivée à la suite d'une culture de type "céréale" (**Tableau 5-1-16**) alors que la plus importante contamination en nivalénol correspond aux cultures de blé suivant une culture de maïs cultivée après une culture de type "autre" (**Tableau 5-1-16**).

De nouveau, ces résultats ne sont pas conformes à ce que l'on attendrait d'après la littérature (et qui est détaillé au chapitre 1). Comme ils pourraient résulter d'interactions fortes avec d'autres éléments du système de culture ou de l'environnement, il convient de les analyser aussi par exploitation et par année. Dans les exploitations B, C, D, E en 2001-02, ainsi que B et C en 2002-03, une diversité de précédents culturaux est observée (**Tableau 5-1-17**). Quatre des cinq parcelles de blé cultivées à la suite d'une culture de maïs ou de type "céréale" (en 2001-02 sur C, D et E ainsi qu'en 2002-03 sur B), se trouvent être les parcelles les plus contaminées (même si ce sont parfois des faibles niveaux de contaminations) en déoxynivalénol et/ou nivalénol (à l'exception des parcelles B en 2002-03) au sein de leur situation environnementale (couple exploitation-année). Dans l'exploitation B en 2001-02, les cultures suivant ces deux types de culture précédente (maïs ou triticale) ne sont pas celles qui se sont avérées les plus contaminées en toxines. De même, dans trois cas sur cinq (exploitations B et D en 2001-02 ainsi que B en 2002-03), les parcelles de blé derrière maïs ou triticale ne sont pas non plus les plus attaquées. Les cultures suivant une culture de type "autre" (légumineuse ou prairie) sont souvent les plus attaquées et peuvent être assez contaminées par nivalénol.

A la lecture de ces résultats, il semble que les cultures de maïs ou de céréales avant un blé ne soient donc pas systématiquement synonymes de contamination en déoxynivalénol et d'attaque de fusariose de l'épi plus importantes, contrairement aux observations généralement proposées dans la littérature.

Dans la littérature, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer les effets du précédent cultural sur le développement de la fusariose de l'épi et sur la production de mycotoxines. On a mis ainsi en avant la nature de la flore présente sur les résidus laissés par la culture précédente, la richesse en azote ou la densité de ces résidus, qui influencerait la conservation et le développement des champignons.

**Tableau 5-1-17 : Niveaux d'attaque et de contamination selon l'histoire culturelle des parcelles agricoles biologiques du réseau.**

a - En 2001-02

Parcelle	Antéprécédent	Précédent	Intensité	Gravité	Déoxynivalénol µg/kg	Nivalénol µg/kg	Nombre de résidus/m <sup>2</sup>	Azote dans les épis à la floraison
BI	Prairie	Maïs	2%	0%	<d <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	0-2	15%
BII	Blé	Triticale/féverole	13%	10%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	121-200	13%
BIII	Prairie	Prairie	17%	3%	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0-2	14%
BIV	Luzerne	Luzerne	23%	1%	60	140	0-2	15%
CI	Pomme de terre	Haricots verts	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0-2	13%
CII	Trèfle	Pomme de terre	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0-2	13%
CIII	Légumes	Haricots verts	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0-2	15%
CIV	Pomme de terre	Maïs	3%	0%	<d <sub>i</sub>	120	0-2	15%
DI	Tournesol	Trèfle	0%	0%	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0-2	16%
DII	Seigle	Trèfle	100%	44%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0-2	15%
DIII	Luzerne	Basilic/Persil	66%	15%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0-2	14%
DIV	Trèfle	Triticale	20%	2%	60	<d <sub>i</sub>	3-20	18%
EI	Blé	Maïs	30%	5%	2250	<q <sub>i</sub>	3-20	18%
EII	Tournesol	Trèfle	0%	0%	190	<d <sub>i</sub>	0-2	17%

b - En 2002-03

Parcelle	Anté-précédent	Précédent	Intensité	Gravité	Déoxynivalénol µg/kg	Nivalénol µg/kg	Nombre de résidus/ m <sup>2</sup>	Azote/ Fructose dans les épis à la floraison	Azote/ Potassium à la floraison
BV	Blé	Maïs	0%	0%	130	<d <sub>i</sub>	21-60	0,8	1,7
BVI	Blé	Maïs	0%	0%	200	<q <sub>i</sub>	121-200	0,9	1,5
BVII	Blé	Triticale/féverole	20%	1%	60	<q <sub>i</sub>	3-20	1,5	1,9
BVIII	Prairie	Prairie	33%	2%	70	80	3-20	1,7	1,5
CV	Trèfle	Trèfle	37%	3%	200	90	0-2	1,5	1,7
CVI	Triticale	Haricots verts	0%	0%	260	<d <sub>i</sub>	0-2	1,2	1,5

< d<sub>i</sub>, teneur en toxine inférieure à la limite de détection (30 µg/ kg) ; < q<sub>i</sub>, teneur en toxine inférieure à la limite de quantification (60 µg/kg) ; nd, écart type non déterminé

En bleu les cultures de maïs en précédent à la culture de blé suivi et les fortes densités de résidus et les fortes teneurs en déoxynivalénol sur ces parcelles. En vert, les situations plus intermédiaires : culture précédent de type "céréale", densité de résidus moyenne et teneurs en déoxynivalénol moyennes sur ces parcelles. En rouge les faibles densités de résidus derrière des culture de maïs. En italique l'exception mentionnée dans le texte.

**Tableau 5-1-18 : Relation entre la variété et les niveaux d'attaque et de contamination**

Exploitation Précédent Année	Parcelle	Variété	Intensité	Gravité	Teneur en déoxynivalénol µg/kg	Azote (épis à floraison), g/kg	Potassium (épis à floraison), g/kg	Fructose (épis à floraison), g/kg
A Féverole 2001-02	AI	Renan	0%	0%	180	16,96	non déterminé	non déterminé
	AII	Renan	13%	7%	<d <sub>i</sub>	15,72	non déterminé	non déterminé
	AIII	Aristos	17%	1%	<d <sub>i</sub>	13,00	non déterminé	non déterminé
D Trèfle 2001-02	DI	Apache	0%	0%	<q <sub>i</sub>	16,31	non déterminé	non déterminé
	DII	Renan	100%	44%	<d <sub>i</sub>	15,25	non déterminé	non déterminé
E Trèfle 2002-03	EIII	Apache	0%	0%	270	15,40	9,72	16,20
	EIV	Renan	20%	1%	850	15,70	10,70	12,80

Nos données ne permettent que de tester la troisième hypothèse, qui est vérifiée : à l'exception de BI et CIV, les parcelles de blé suivant une culture de maïs présentent plus de résidus que les parcelles suivant une culture de céréale ou de légumineuse (**Tableau 5-1-17**). La parcelle BI présente une densité de résidus de maïs plus faible que la densité de résidus laissés par les autres précédents culturaux sur les parcelles du même couple année-exploitation. Au regard de ces résultats, il semble exister une interaction, assez attendue, entre le type de précédent culturaux et la densité des résidus : si la culture précédente est un maïs et qu'il y a des résidus, alors la production de déoxynivalénol est importante (parcelles EI, BV et BVI), mais en absence de résidus de maïs il n'y a pas de forte production de déoxynivalénol (parcelles BI et CIV) ; si la culture précédente est de type "céréale" et qu'il y a des résidus, alors la production de déoxynivalénol est moyenne : parcelles DIV et BVII. La parcelle BII semble faire exception, peut-être à cause de la forte pluviométrie pendant le remplissage des grains (119 mm contre 85 et 84 mm pour DIV et BVII). La dernière parcelle présentant une forte densité de résidus est BVIII ; la prairie qui a occupé cette parcelle pendant les deux années précédentes pourrait avoir sélectionné une autre population de pathogènes que dans les autres parcelles de l'exploitation-année : en effet, les deux parcelles présentant cette même histoire culturale (BIII et BVIII) sont faiblement contaminées par des toxines, tout en présentant des niveaux d'attaque assez élevés.

#### **Effets de la variété**

La littérature place le choix de la variété plantée comme la troisième pratique agricole déterminante pour les futurs niveaux d'attaque et de contamination. Jusqu'à présent, aucune étude n'a caractérisé le type de résistance des variétés cultivées en France vis-à-vis de la production de toxines fusariennes.

Aucun effet évident de la variété cultivée sur les attaques ou les contaminations n'a été observé sur notre réseau. Un doute est néanmoins permis à propos de l'exceptionnel niveau de contamination par déoxynivalénol de la parcelle EI, qui est la seule parcelle semée avec la variété *Isengrain*, variété non classiquement utilisée par les agriculteurs biologiques en raison de sa très grande sensibilité aux maladies. Néanmoins, la conclusion selon laquelle le niveau de contamination de cette parcelle s'expliquerait par le choix de cette variété ne peut pas être validée sans tests variétaux dans d'autres conditions environnementales et/ou sans test génétique de la variété. Dans les "exploitation-année" où des parcelles ne diffèrent que par la variété semée (**Tableau 5-1-18**), il n'apparaît aucune différence franche entre la variété *Renan* et la variété *Aristos* (exploitation A), bien que la variété *Renan* soit considérée comme la variété française la plus résistante à la fusariose. De même, la variété *Apache* (pourtant réputée plus sensible) apparaît moins contaminée et attaquée que la variété *Renan* (exploitations D et E).

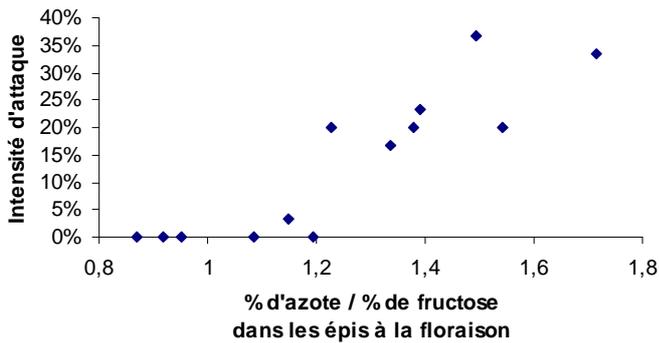
#### **Effets d'un apport d'azote**

Cette pratique n'est pour l'instant pas considérée comme une pratique très déterminante du développement de la fusariose et de la production de mycotoxines, car les résultats rencontrés dans la littérature sont très contradictoires (**Chapitre 1**). Le Groupement d'Agriculteurs Biologiques d'Ile-de-France a cependant réalisé, pendant nos deux années de travail, des essais de fertilisation azotée (à base de fientes de poule) sur blé biologique, dans deux exploitations différentes (celles que nous avons appelées B et D). Les résultats présentés dans l'**Annexe 3** ne permettent pas d'observer un effet significatif de la dose d'azote apportée sur la contamination des grains en toxines ; cependant, malgré des apports assez différents, les rendements et les teneurs en protéines dans les grains ne sont pas significativement différents après les différents traitements, ce qui suggère que l'azote apporté n'a en fait, pas vraiment profité à la nutrition de la plante, et rend l'expérience peu exploitable.

**Figure 5-1-7 : Relation entre les niveaux d'attaque et le rapport azote sur fructose dans les épis à la floraison, sur les parcelles du réseau (2002-03)**

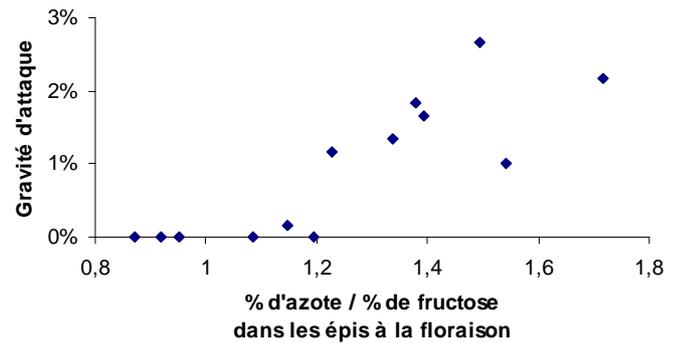
a- Intensité d'attaque

$R^2=0,79, \alpha < 0,0001$



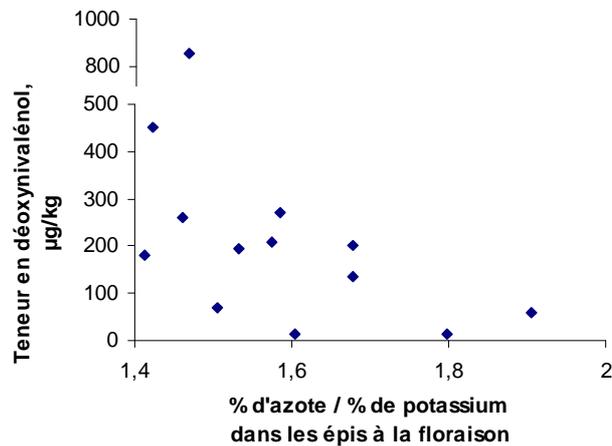
b-Gravité d'attaque

$R^2= 0,71, \alpha < 0,0001$



**Figure 5-1-8 : Relation entre la contamination par déoxynivalénol et la composition chimique des épis à la floraison, sur les parcelles du réseau (2002-03)**

$R^2= 0,25, \alpha < 0,1$



### 1.3.3- Influence de l'état du peuplement

#### Effets de la composition chimique des grains

En 2002-03, sur l'ensemble des parcelles du réseau, le niveau d'intensité ou de gravité des attaques augmente avec le rapport entre le contenu en azote et le contenu en fructose des épis à la floraison (**Figure 5-1-7**). Dans le cas de la gravité, ces résultats doivent toutefois être considérés avec précaution, vu les faibles gravités d'attaque observées. De manière moins nette, le rapport entre le taux d'azote et celui de potassium des épis à la floraison influencerait négativement les niveaux de contamination par déoxynivalénol (**Figure 5-1-8**) ; et comme seulement deux parcelles présentent des taux de nivalénol quantifiables, nous ne pouvons pas mettre en évidence d'effet de la composition chimique des plantes sur les taux de contamination en cette deuxième toxine. Dans la littérature, la fusariose de l'épi est favorisée par les faibles taux de sucre dans les tissus (Horsfall and Dimond, 1957) et les stades de résistance à la fusariose sur maïs correspondent à des états à forts taux de glucides (Messiaen, 1957), tandis que la quantité de glucides varie inversement proportionnellement à l'apport d'azote (Cassini, 1970), ce qui entraîne que la fusariose devrait être favorisée par de forts taux en azote : cela est bien vérifié sur nos résultats. Par contre, l'implication du potassium dans la détermination de la production de déoxynivalénol, que nous avons obtenu, n'apparaît pas dans la littérature (**Chapitre 1**).

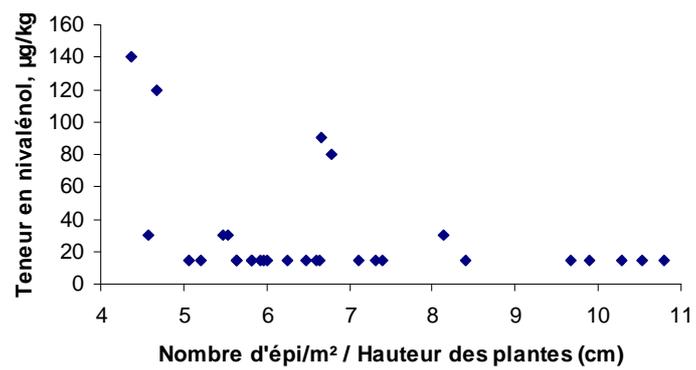
La relation entre le rapport azote/fructose et les symptômes de fusariose des épis semble indiquer l'existence d'un seuil en-deçà duquel la maladie ne peut pas se développer (du moins selon notre méthode de notation) et au-delà duquel les niveaux d'attaques augmentent (seuil aux alentours de 1,1). Au-delà d'un rapport azote/fructose de 1,4-1,5, les niveaux d'attaque ont l'air plus constant mais cela demande à être vérifié.

Si l'on ne considère que les parcelles où on a pu observer un effet de la culture précédente (**Tableau 5-1-17**), l'interaction entre l'histoire culturale et le taux d'azote semble influencer les niveaux de maladie. Ainsi, par exemple pour l'exploitation B en 2002-03, la culture suit une culture de maïs (avec de fortes densités de résidus) mais présente un ratio azote sur fructose dans les épis à la floraison trop faible ( $< 1,1$ ) pour le développement de la maladie : aucune attaque n'est enregistrée. Le niveau de déoxynivalénol est plus faible sur la parcelle BVIII (à faible rapport des taux d'azote et de potassium dans les épis à la floraison) que sur la parcelle BV (à plus fort rapport azote sur potassium), contrairement à ce que l'on observe sur l'ensemble des parcelles du réseau ou sur les parcelles ayant la même histoire culturale (comme BV et BVI) ; or, la culture de blé sur la parcelle BVIII suivait deux ans de prairie, alors que la culture de blé sur la parcelle BV faisait suite à une culture de maïs précédée d'un blé et présentant des résidus significatifs. Ces résultats, même s'ils doivent être confirmés sur d'autres parcelles et dans des gammes de variation plus étendues, semblent indiquer que les effets des précédents culturaux observés sur les niveaux d'intensité d'attaque et de contamination par déoxynivalénol dépendent d'une triple interaction entre les précédents culturaux, la densité de résidus et la nutrition des épis à la floraison en azote, en fructose et potassium. Le rôle de l'azote sur les niveaux d'attaque et de contamination pourrait être renforcé par nos conditions environnementales de forte carence, et pourrait être (sans que l'on puisse vérifier) la cause de nos résultats pas toujours comparables à ceux de la littérature (comme l'absence d'un effet systématique du précédent cultural, notamment dans le cas d'un précédent maïs).

Aucune hypothèse n'est véritablement avancée dans la littérature sur l'origine des effets de la composition des épis à la floraison. Cette composition est influencée par beaucoup d'éléments du milieu, par des techniques culturales comme la fertilisation, par la capacité du couvert à absorber les éléments minéraux, ou encore par la migration des nutriments des feuilles vers les grains. Cette composition traduit aussi la structure des cellules, conditionnant leur résistance à l'infection et à la propagation du champignon dans la plante. En effet, le fructose est un sucre soluble, permettant le

Figure 5-1-9 : Relation entre la contamination par nivalénoï et la densité du couvert, sur l'ensemble des parcelles du réseau (2001-02 et 2002-03)

$R^2=0,36$ ,  $\alpha < 0,05$



transfert du carbone des feuilles vers les grains avant la formation de l'amidon ou d'autres composés complexes. A floraison, le rapport entre l'azote et le fructose caractérise donc bien l'état nutritionnel des plantes. Par ailleurs, l'implication de ce rapport dans la maladie peut s'expliquer par le fait que les agents de la fusariose (*Fusarium* et *Microdochium*) sont des champignons qui poussent bien sur des milieux pauvres en sucre (Bakan, 1998) et que, comme tous les champignons, leur croissance nécessite de l'azote. De ce fait, un manque d'azote est un stress nutritionnel fort pour le champignon qui pourrait peut-être expliquer une plus forte production de déoxynivalénol. D'autant plus quand on considère le rapport de l'azote au potassium, puisque le potassium est un déterminant de la résistance mécanique des cellules (Trolldenier, 1969), un taux élevé de potassium limitant donc la propagation des champignons dans les cellules (alors que déoxynivalénol facilite cette propagation, Snijders and Krechting, 1992) : d'où l'idée plausible qu'en présence de plus de potassium (rapport azote sur potassium faible) la migration du champignon nécessite une plus grande production de déoxynivalénol.

#### ***Effets de la densité du peuplement et de la hauteur des épis***

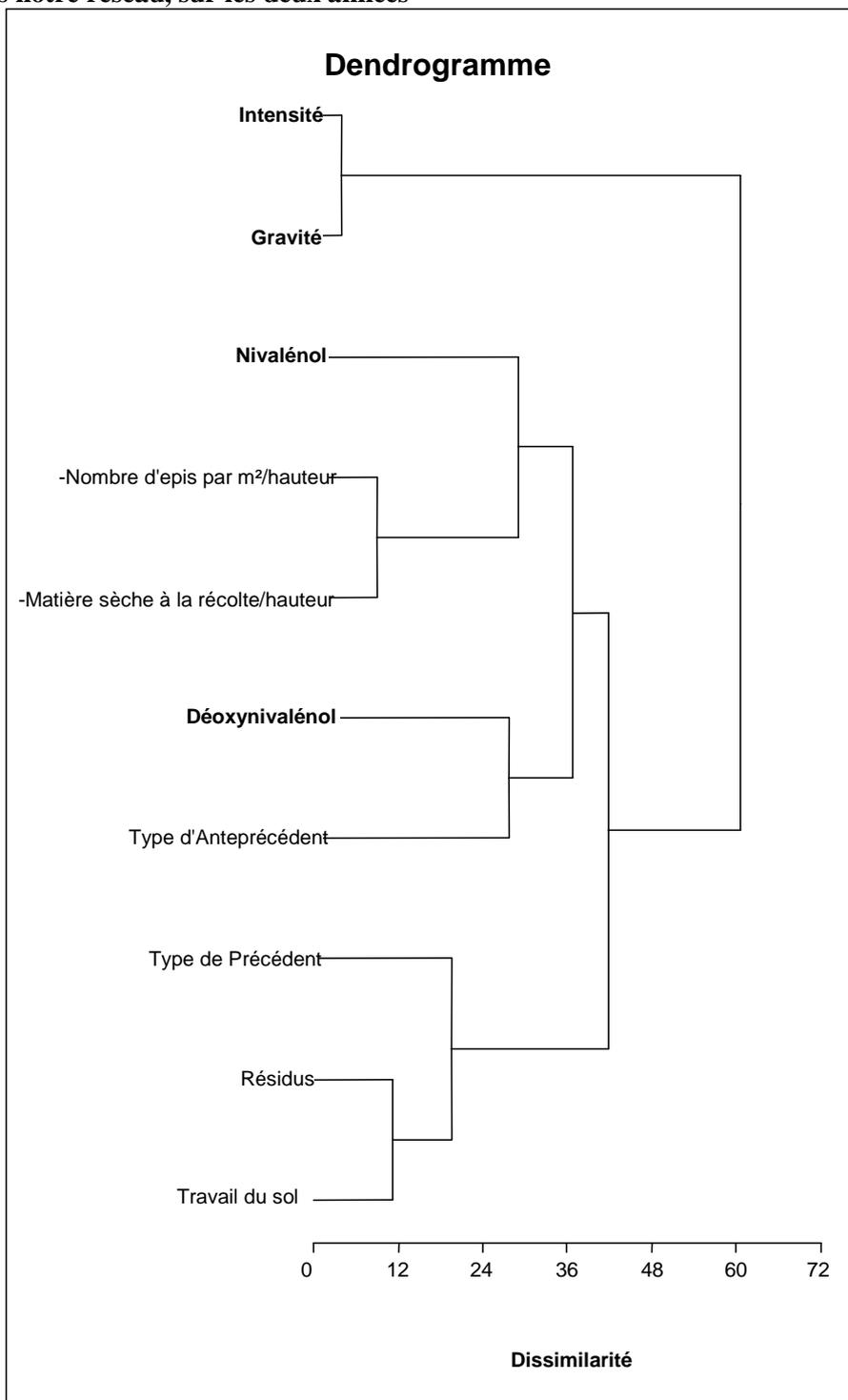
L'hypothèse selon laquelle la densité et la hauteur du couvert végétal influenceraient la maladie a pour origine l'idée que la dispersion des spores de champignons par "splashing" pourrait être limitée en présence d'obstacles, c'est-à-dire quand le peuplement est dense et les épis hauts. Sur notre réseau, seule la contamination par nivalénol pourrait paraître légèrement dépendre de ce paramètre, puisque (quand elle est quantifiable) elle semble diminuer avec le ratio entre la densité des cultures et la hauteur des épis (**Figure 5-1-9**), c'est-à-dire quand les obstacles à la dispersion par splashing augmentent.

#### ***1.3.4- Effets des systèmes de culture en conduite biologique***

Dans la littérature, la seule interaction entre pratiques culturales clairement énoncée et influençant les attaques de fusariose et les contaminations en toxines est l'augmentation des risques en cas de blé semé sans labour derrière un maïs. Nous avons déjà vu que sur le réseau, une parcelle (BVI) a été cultivée avec cette combinaison réputée à risque, mais qu'elle n'a pas présenté de niveaux d'attaque ou de contamination particulièrement élevés. En revanche, nous avons observé une interaction entre la densité de résidus, l'histoire culturale et la nutrition des épis. Il semble donc que c'est la conjugaison de plusieurs pratiques qui conditionnerait les niveaux d'attaque et de contamination et serait "la" pratique la plus risquée.

Pour obtenir une vision plus globale des résultats précédents, nous avons classé, selon la méthode de classification ascendante hiérarchique, les différentes variables que nous avons étudiées tout au long de cette partie. La variable "variété" n'a pas été prise en compte, en raison des résultats obtenus qui s'avèrent insuffisants ; ainsi que les interactions mises en évidence, en raison d'absence d'un codage simple à réaliser. Cette classification pour l'ensemble des parcelles du réseau, sur les deux années d'étude (**Figure 5-1-10**) comme sur 2001-02 seulement (non montré), met en évidence deux branches distinctes : l'une comprend les variables caractérisant les *symptômes* de la fusariose sur épi, l'autre caractérisant les *contaminations en mycotoxines*. On peut noter que, sur la première branche, les niveaux d'intensité d'attaque et de gravité d'attaque sont très liés entre eux sans qu'une pratique et/ou un état du couvert particulier ne jouent un rôle prépondérant. La seconde branche se sépare en deux, l'une regroupant le travail du sol, le précédent cultural et la densité de résidus, l'autre se séparant encore en deux et associant d'un côté la contamination par déoxynivalénol et le type d'antécédent, et de l'autre la contamination par nivalénol et la densité du couvert ainsi que sa hauteur. Ceci semble indiquer que des mécanismes différents sont à l'œuvre dans la détermination des attaques de l'épi et de la production de toxines.

**Figure 5-1-10 : Classification ascendante hiérarchique des pratiques agricoles et des états du couvert dans notre réseau, sur les deux années**



Les différentes variables qualitatives sont codées de telle sorte que le risque le plus grand (selon la littérature) soit associé au code le plus grand (**Chapitre 3**). Le signe – rend compte d'un sens de variation négatif d'une variable quantitative (rapport entre le nombre d'épi par m<sup>2</sup> ou la matière sèche aérienne du couvert et sa hauteur) dans cette classification.

L'ajout des variables de nutrition pour les parcelles de 2002-03 relègue les pratiques agricoles et les états de densité du couvert sur une branche indépendante du dendrogramme (**Figure 5-1-11**). Comme on l'a vu plus haut, la composition chimique des épis à la floraison semble alors avoir une influence prépondérante, par rapport aux autres variables du couvert et/ou aux pratiques culturales. La contamination en déoxynivalénol est fortement dépendante du rapport entre les taux d'azote et de potassium dans les épis à floraison, tandis que les niveaux d'attaque et de contamination en nivalénol sont eux dépendants du rapport entre les taux d'azote et de fructose dans les épis à floraison. On notera aussi que les indices de dissimilarité sont plus faibles sur cette figure que sur la précédente, rendant compte d'une meilleure agrégation des variables.

#### 1.4- Diagnostic agronomique global sur les parcelles du réseau

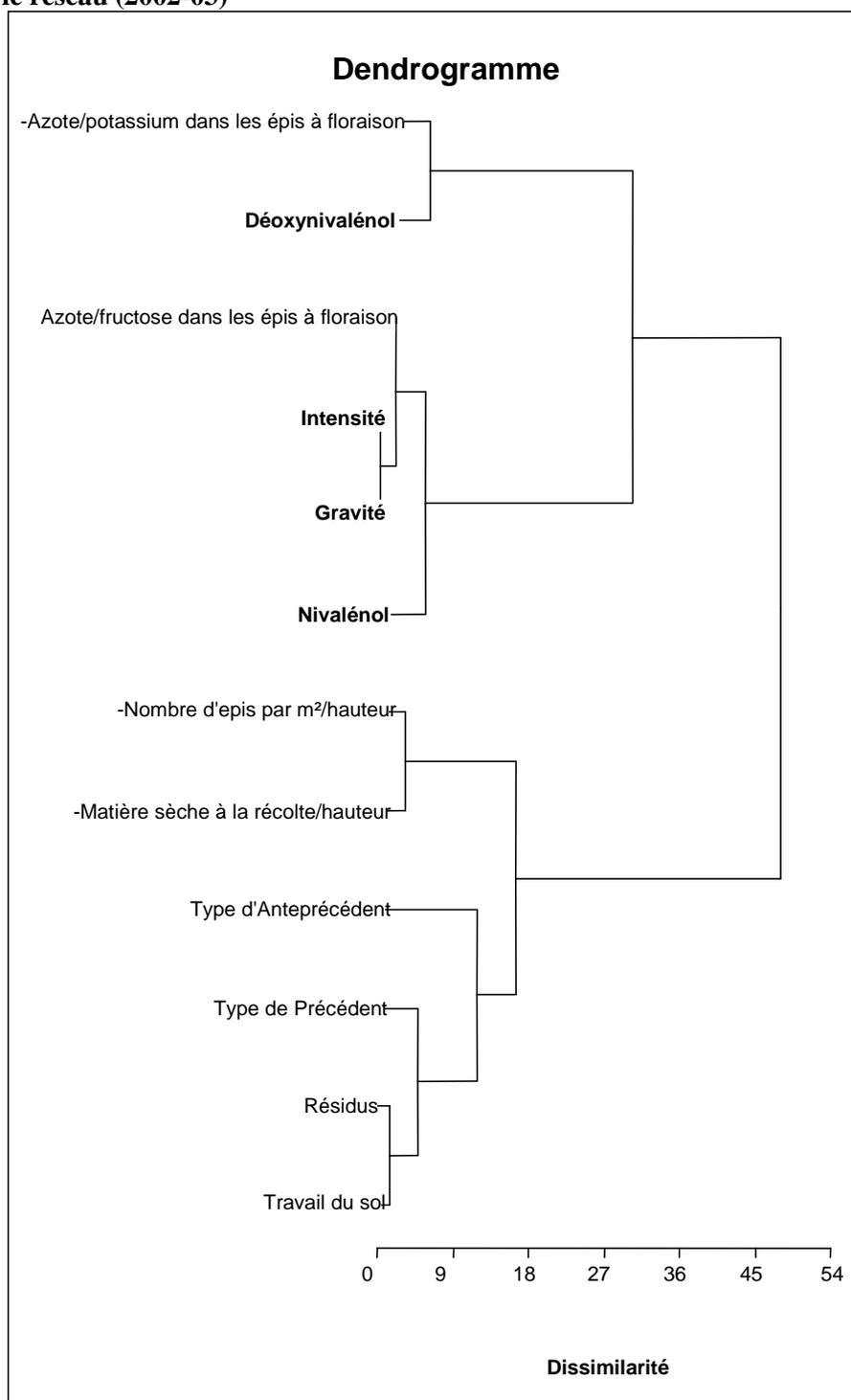
Finalement, la **Figure 5-1-12** montre que pour notre diagnostic agronomique sur l'ensemble des parcelles du réseau pendant les deux années de l'étude, ajouter des variables climatiques aux variables déjà prises en compte ne modifie guère les liens entre les variables de contamination ou d'attaque par la maladie et les pratiques agricoles ou les états du couvert : tout au plus, une liaison entre les niveaux d'attaque et l'antéprécédent cultural apparaît, aux dépens de la liaison entre la contamination par déoxynivalénol et l'antéprécédent cultural. La contamination par nivalénol semble principalement liée à la température avant la floraison et avant la récolte. La contamination par déoxynivalénol semble également essentiellement liée au climat (à savoir l'humidité pendant le cycle du blé, la température après la floraison, et la pluviométrie en fin de remplissage des grains). Les niveaux d'attaque apparaissent plutôt indépendants des variables climatiques, des états des couverts et des pratiques culturales renseignées. On notera que si l'allure du dendrogramme évolue peu, les distances de dissimilarité, en revanche, augmentent beaucoup entre les **Figures 5-1-10** et **5-1-12**, traduisant les moins bonnes liaisons entre les différentes branches et les différents groupes de paramètres.

De même, la prise en compte des variables climatiques et de nutrition pour un diagnostic sur les seules cultures de 2002-03 (**Figure 5-1-13**) ne modifie pas l'aspect général du dendrogramme précédemment obtenu pour cette année-là : les variables de nutrition se placent au plus près des variables caractérisant l'attaque des épis par la fusariose. Les niveaux d'attaque et de contamination en nivalénol dépendent de la nutrition en azote et en fructose des épis à la floraison ainsi que des précipitations pendant les 5 jours avant la récolte. Les niveaux de contamination en déoxynivalénol sont, eux, fortement dépendants du rapport entre les taux d'azote et de potassium dans les épis à floraison, ainsi que de deux variables climatiques : moyenne des températures moyennes pendant les 9 jours avant la récolte, cumul des précipitations pendant les 28 jours avant la récolte. Les niveaux d'attaque et de contamination en déoxynivalénol sont très peu reliés aux variables concernant les pratiques agricoles et la densité du couvert.

Il ressort des régressions linéaires multiples entre les variables mentionnées sur le dendrogramme de la **Figure 5-1-13** que plus de 80% de la variation des niveaux d'attaque de 2002-03 sont liés au ratio entre les taux d'azote et de fructose dans les épis à la floraison et à la somme des précipitations pendant les 5 jours avant la récolte (**Tableau 5-1-19**). De même, la contamination en déoxynivalénol des parcelles agricoles cette année-là dépend pour plus de 40% du ratio entre les taux d'azote et de potassium dans les épis à floraison et de la température moyenne pendant les 9 jours avant la récolte (**Tableau 5-1-19**).

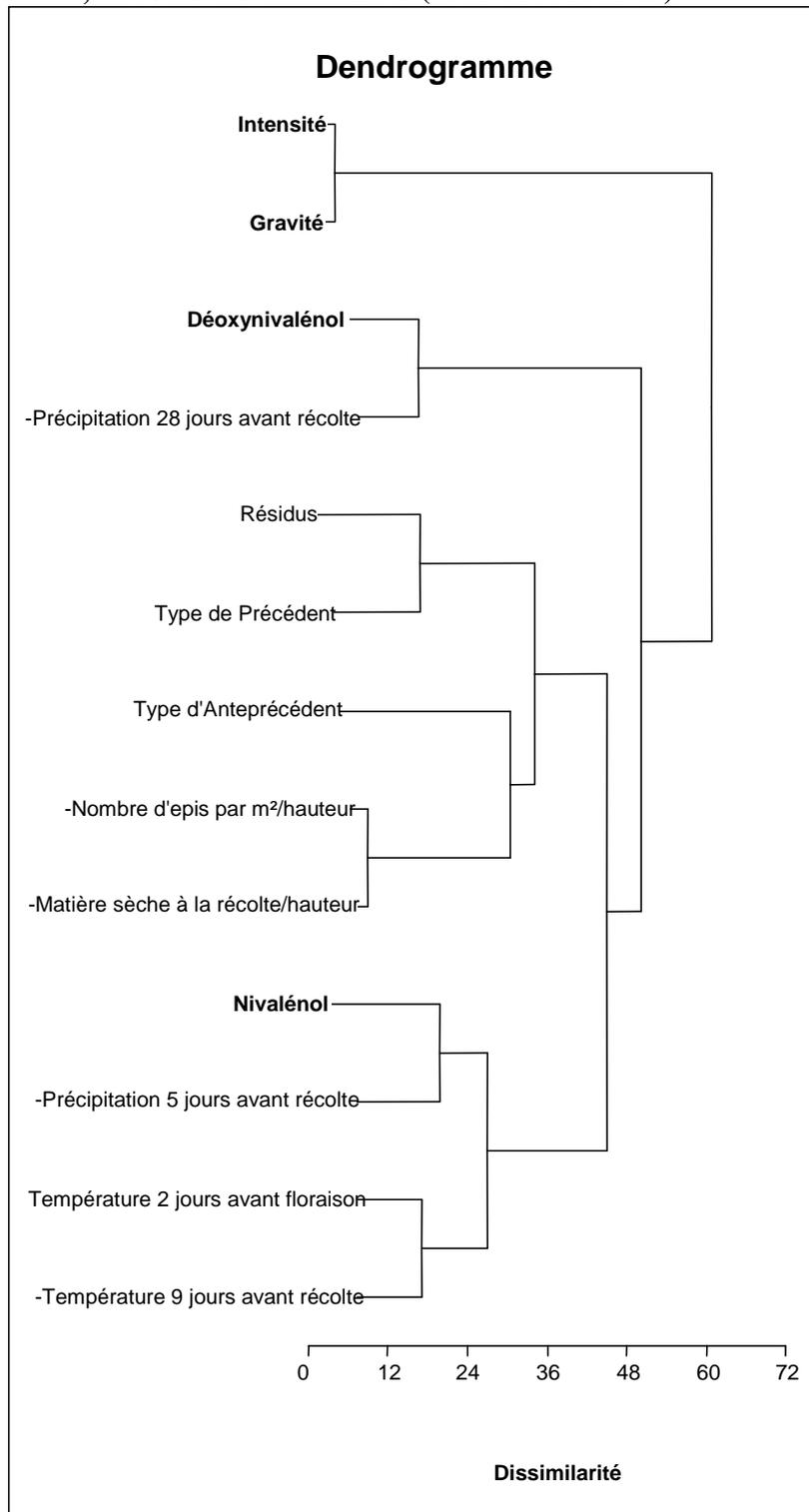
Il semble donc que les deux toxines trouvées, nivalénol et déoxynivalénol, ne soient pas influencées par les mêmes déterminants : déoxynivalénol dépendrait du rapport entre les taux d'azote et de potassium et du climat, nivalénol serait plutôt fonction du rapport entre les taux d'azote et de fructose et du climat, et du peuplement (bien que ce dernier résultat soit sujet à caution en raison du nombre de

**Figure 5-1-11 : Classification ascendante hiérarchique des pratiques agricoles et des états du couvert sur le réseau (2002-03)**



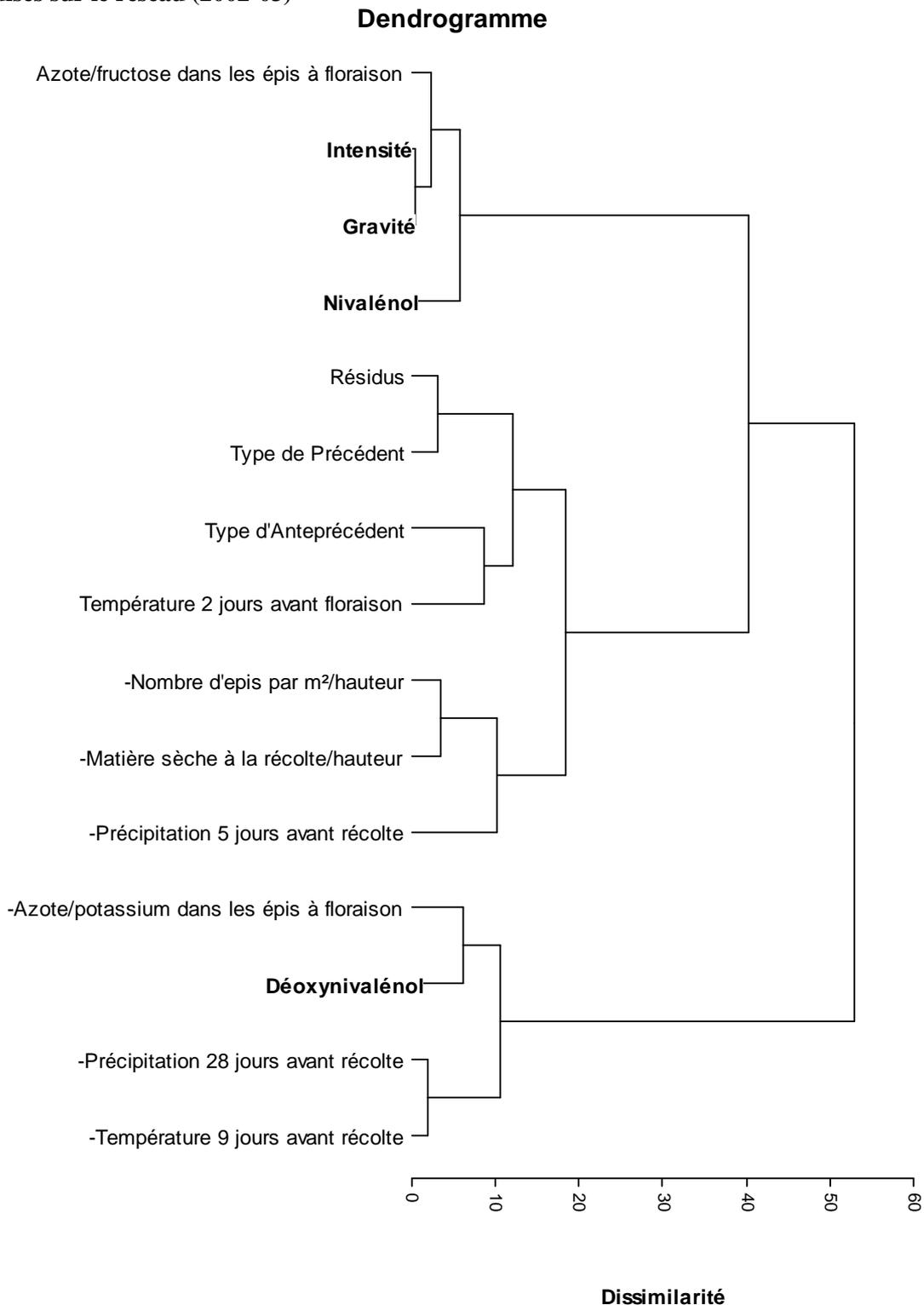
Les différentes variables qualitatives sont codées de telle sorte que le risque le plus grand (selon la littérature) soit associé au code le plus fort (**Chapitre 3**). Le signe – rend compte d'un sens de variation négatif d'une variable quantitative (rapport azote potassium dans les épis à la floraison, rapport entre le nombre d'épi par m<sup>2</sup> ou la matière sèche aérienne du couvert et sa hauteur) dans cette classification.

**Figure 5-1-12 : Classification ascendante hiérarchique de l'ensemble des variables d'intérêt acquises sur le réseau, au cours des deux années (2001-02 et 2002-03)**



Les différentes variables qualitatives sont codées de telle sorte que le risque le plus grand (selon la littérature) soit associé au code le plus fort (**Chapitre 3**). Le signe – rend compte d'un sens de variation négatif d'une variable quantitative (précipitation, température, rapport entre le nombre d'épi par m<sup>2</sup> ou la matière sèche aérienne du couvert et sa hauteur) dans cette classification.

**Figure 5-1-13 : Classification ascendante hiérarchique de l'ensemble des variables d'intérêt acquises sur le réseau (2002-03)**



Les différentes variables qualitatives sont codées de telle sorte que le risque le plus grand (selon la littérature) soit associé au code le plus fort (**Chapitre 3**). Le signe - rend compte d'un sens de variation négatif d'une variable quantitative dans cette classification.

**Tableau 5-1-19 : Résultats des régressions linéaires multiples entre les variables de peuplement ou de climat et les niveaux d'attaque ou de contamination par déoxynivalénol, sur les parcelles du réseau en 2002-03**

Variables explicatives		$\alpha_{\text{partiel}}$	R <sup>2</sup> et $\alpha$ du modèle
Intensité d'attaque	Ratio du taux d'azote sur celui de fructose des épis à floraison	****	R <sup>2</sup> =0,88
	Somme des précipitations pendant les 5 jours avant la récolte	**	****
Gravité d'attaque	Ratio du taux d'azote sur celui de fructose des épis à floraison	****	R <sup>2</sup> =0,82
	Somme des précipitations pendant les 5 jours avant la récolte	**	***
Déoxynivalénol	Ratio du taux d'azote sur celui de potassium des épis à floraison	ns	R <sup>2</sup> =0,42
	Température moyenne pendant les 9 jours avant la récolte	ns	*

ns non significatif, \*  $\alpha < 0,1$  ; \*\*  $\alpha < 0,5$  ; \*\*\*  $\alpha < 0,001$  ; \*\*\*\*  $\alpha < 0,0001$



données). En outre, l'itinéraire technique d'une parcelle semblerait ne pas trop influencer les niveaux de contamination en déoxynivalénol à la récolte.

*En conclusion de cette partie, nous notons avoir principalement eu à analyser des parcelles faiblement attaquées par la fusariose de l'épi et faiblement contaminées par les mycotoxines associées, ainsi qu'un petit nombre de parcelles fortement attaquées et/ou contaminées. Cette répartition des valeurs des niveaux d'attaques et/ou de contamination est peu favorable à une analyse statistique. Dans cette situation, nous n'avons pu retrouver les effets des pratiques culturales classiquement décrits dans la littérature qu'en tenant compte des interactions entre les différents paramètres susceptibles d'influer sur la maladie, mais pas lorsque nous ne considérons ces paramètres que de façon isolée, ce qui souligne l'importance de la méthode d'analyse employée. De nombreuses interactions semblent donc moduler les niveaux d'attaque des épis et de contamination des grains.*

*Il ressort notamment de notre étude que les effets du climat (notamment ceux de la pluviométrie à la floraison) ne sont ni systématiques ni dépendants de la seule période de la floraison, comme on le décrit généralement dans la littérature. Nous avons également mis en évidence que les variables décrivant l'état du peuplement (notamment sa composition chimique) sont des éléments qui pourraient être très importants pour expliquer les niveaux d'attaque et de contamination rencontrés, du moins dans nos situations. Les études menées sur ces aspects sont cependant à approfondir (sur d'autres environnements notamment), puisqu'elles ne permettent pas de rendre compte de la totalité des parcelles, et que les corrélations entre attaque ou contamination et pratiques culturales sont fragiles. Des études en situation de moindre carence azotée des plantes seront également utiles pour valider les premières conclusions et étendre les gammes de validité de ces résultats. Par ailleurs, l'état du couvert pourrait aussi affecter et/ou être affecté par les champignons présents.*

**Tableau 5-2-1 : Caractérisation du climat des quatre dernières années, sur l'essai systèmes (1999-00, 2000-01, 2001-02 et 2002-03)**

Années	Cumul des précipitations (mm)				Moyenne des températures						Moyenne des humidités				Moyenne du rayonnement journalier (Joules/cm <sup>2</sup> )	
	températures moyennes journalières (°C, base 0)		minimales journalières (°C)		moyennes journalières (°C)		maximales journalières (°C)		maximales journalières (%)		minimales journalières (%)		rayonnement journalier			
	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.	Oct-fév.	Mar-juil.		
1999-00	376	411	1015	2059	3,3	8,7	6,7	13,5	10,0	18,3	100	99	74	51	419	1664
2000-01	439	429	1137	2059	4,7	8,8	7,5	13,4	10,3	18,1	98	90	78	47	428	1531
2001-02	304	254	1141	2073	4,4	8,3	7,6	13,6	10,7	18,8	92	90	66	45	468	1625
2002-03	326	197	1017	2274	3,6	9,4	6,7	14,9	9,8	20,4	92	87	67	39	428	1757

Oct-fév. : période "hivernale" du 1<sup>er</sup> octobre au 28 février. Mar-juil. : période "estivale" du 1<sup>er</sup> mars au 31 juillet, nd non déterminé

**Tableau 5-2-2 : Evaluation des résidus des différents systèmes de culture de l'essai systèmes (2001-02 et 2002-03)**

	3 à 20 résidus / m <sup>2</sup>	21 à 60 résidus / m <sup>2</sup>	61 à 120 résidus / m <sup>2</sup>	hors classe <sup>a</sup>
2001-02	Autres parcelles	Parcelles du système conventionnel <small>bloc II</small>		Parcelles du système sans travail du sol
2002-03	Parcelles des systèmes conventionnel <small>bloc I</small> biologique <small>Charger bloc II, Renan bloc I</small>	Autres parcelles	Parcelles du système intégré <small>bloc I</small>	

L'ensemble des variétés, traitements fongicides et des blocs est considéré. <sup>a</sup> cf. le texte.

**Tableau 5-2-3 : Résultats d'analyses de variance des effets des différents systèmes de culture sur l'état du couvert végétal à floraison, dans l'essai systèmes (2001-02 et 2002-03)**

	Gamme de variation	Système de culture	Classement de Bonferroni	$\alpha$
Matière sèche aérienne de blé, g/m <sup>2</sup>	500-1000	Système biologique	b	****
	1000-2000	Autres systèmes	a	
Nombre d'épis de blé / m <sup>2</sup>	200-500	Systèmes biologique et sans travail du sol	b	****
	500-700	Système intégré	a	
	600-700	Système conventionnel	a	
Hauteur des épis de blé, cm	50-60	Système biologique	b	**
	60-75	Autres systèmes	a	
Taux de recouvrement du sol par les adventices	0-10%	Système conventionnel	b	****
	0-30%	Systèmes biologique et intégré	b	
	30-80%	Système sans travail du sol	a	
Indice de nutrition azotée	0,4-0,6	Système biologique	c	****
	0,6-0,9	Systèmes intégré et sans travail du sol	b	
	0,9-1,1	Système conventionnel	a	

L'ensemble des variétés, traitements fongicides et des blocs est considéré.

\*\*  $\alpha < 0,5$  ; \*\*\*  $\alpha < 0,001$  ; \*\*\*\*  $\alpha < 0,0001$

## 2- Influence des systèmes de culture sur l'essai systèmes

### 2.1- Caractérisation des parcelles de l'essai

L'essai systèmes a été démarré en 1997-98, mais le suivi de la fusariose de l'épi n'a été démarré qu'en 1999-00 ; la caractérisation des sols et des états du couvert en rapport avec les hypothèses de notre problématique n'a quant à elle réellement débuté qu'en 2001-02.

#### 2.1.1- Caractérisation environnementale

##### *Conditions climatiques générales*

Sur les années pendant lesquelles les attaques de fusariose de l'épi ont été suivies sur l'essai systèmes, de 1999-00 à 2002-03, on a observé peu de différences climatiques d'une année sur l'autre (**Tableau 5-2-1**). Néanmoins, les deux premières années, notamment les deux premiers printemps, ont connu de plus fortes précipitations que les deux années suivantes (plus de 400 mm lors des deux premières saisons estivales contre à peine 250 mm la troisième et moins de 200 mm lors de la quatrième) et l'été de la dernière année a connu des températures plus importantes que lors des autres étés (près de 15°C en moyenne contre 13,5°C les autres années, **Tableau 5-2-1**).

##### *Caractérisation du sol des parcelles (caractérisation "édaphique")*

La texture du sol de l'essai est "limoneuse moyenne". Le taux de matière organique est compris entre 15 et 20 g/kg pour tous les blocs, quel que soit le système de culture appliqué. Le rapport du taux de carbone sur celui en azote est également relativement similaire dans tous les différents systèmes de culture (et vaut environ 10). L'**Annexe 2** présente la composition des sols de l'essai en 2001-02 et 2002-03.

#### 2.1.2- Caractérisation du couvert végétal

La caractérisation des états des couverts est présentée ici pour permettre une comparaison avec les parcelles agricoles biologiques précédemment suivies.

##### *Densité de résidus à la sortie de l'hiver*

Le **Tableau 5-2-2** montre le résultat de cette évaluation pour les parcelles correspondant aux quatre systèmes de culture étudiés. Dans le système sans travail du sol avec couverture permanente, dénombrer les résidus de la précédente culture commerciale n'est pas chose aisée, du fait du mélange de ces résidus avec les débris de la couverture : comme ce qui nous importe avant tout dans cette étude, c'est le recouvrement du sol par des supports végétaux (assurant la survie des champignons) quels qu'ils soient, nous avons simplement noté "hors classe" la grande densité des résidus en système sans travail du sol et avec couverture permanente. Sur l'ensemble des autres systèmes, on constate des densités de résidus faibles (de 3 à 20 résidus par m<sup>2</sup>) ou moyennes (de 21 à 60 résidus/m<sup>2</sup>). En 2002-03, deux parcelles cultivées en système intégré ont présenté une plus forte densité de résidus (de 60 à 121 résidus/m<sup>2</sup>).

##### *Caractérisation générale des peuplements*

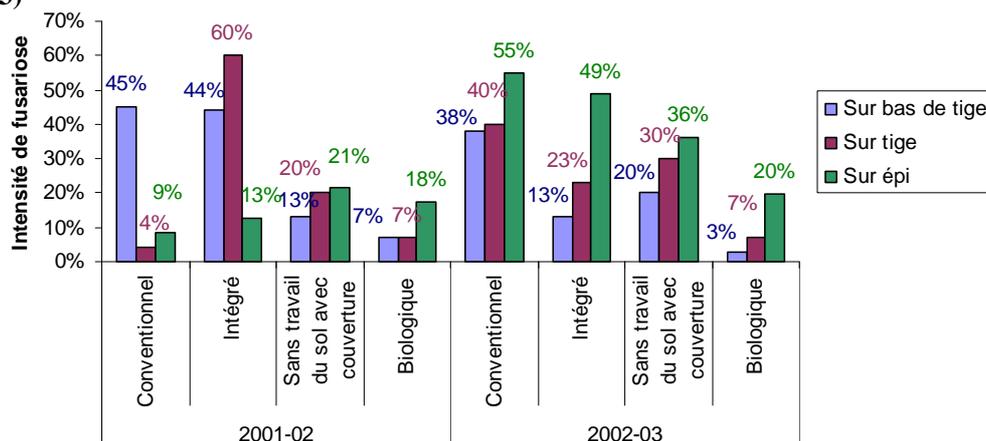
Le **Tableau 5-2-3** montre le résultat de l'analyse de nos diverses mesures. Le système de culture "biologique" se caractérise à la floraison par une plus faible densité de blé (matière sèche aérienne et nombre d'épis), et par un couvert plus pauvre en azote et moins haut que dans les autres systèmes de culture. Le système conventionnel présente à la floraison un plus grand nombre d'épis/m<sup>2</sup>, une plus faible présence d'adventices et un optimum de nutrition azotée pour le couvert. Les autres systèmes présentent des couverts intermédiaires (en densité comme en niveau de satisfaction des besoins en azote). Le système sans travail du sol a le niveau le plus élevé de recouvrement de la parcelle par les adventices.

**Tableau 5-2-4 : Teneurs en divers éléments des épis à la floraison (en 2002-03 dans l'essai) : analyses de variance des effets des différents systèmes de culture sur ces teneurs**

Teneur, g/kg de matière sèche	Gamme de variation	Système de culture	Classement de Bonferroni	$\alpha$
Azote	12-16	Système biologique	b	**
	18-21	Autres systèmes	a	
Phosphore	2-3	Autres systèmes	b	**
	4	Système intégré	a	
Potassium	8-10	Autres systèmes	b	**
	12-13	Système intégré	a	
Magnésium	0,8-1,3	Tous systèmes sans distinction possible entre les systèmes		ns
Glucose	2-3	Système intégré	c	**
	4-8	Autres systèmes	b	
	9-11	Système biologique	a	
Fructose	3-9	Système intégré et conventionnel sans fongicide	c	**
	10-12	Autres systèmes	b	
	19-28	Système biologique	a	
Saccharose	8-17	Autres systèmes	b	**
	20-22	Système biologique	a	

L'ensemble des variétés, traitements fongicides et des blocs est considéré.  
ns, non significatif ; \*\*,  $\alpha < 0,5$

**Figure 5-2-1 : Intensité des attaques de fusariose sur bas de tiges et tiges, à la floraison (2001-02 et 2002-03)**



**Tableau 5-2-5 : Composantes du rendement et teneur en protéines des grains à la récolte**

		Poids moyen d'un grain à 15% d'humidité, mg	Nombre de grains par m <sup>2</sup>	Rendement, q/ha (à 15% d'humidité)	Teneur en protéines des grains	
Conduite cohérente	2001-02	Conventionnel	57	20710	99	10%
		Intégré	53	22050	99	10%
		Sans travail du sol	57	20190	98	9%
		Biologique	49	15070	63	8%
	2002-03	Conventionnel	41	29980	118	14%
		Intégré	43	20530	89	13%
		Sans travail du sol	42	21840	92	13%
		Biologique	45	13480	61	10%
Conduite de "contrôle", variété <i>Charger</i> sans fongicide	2001-02	Conventionnel	42	30000	104	11%
		Intégré	46	23450	92	10%
		Sans travail du sol	55	18810	88	9%
		Biologique	58	12940	63	9%
	2002-03	Conventionnel	37	25660	94	14%
		Intégré	39	22980	88	12%
		Sans travail du sol	44	17030	74	12%
		Biologique	41	13940	57	10%

Le système "sans travail du sol" correspond au système sans travail du sol avec couverture permanente

Le **Tableau 5-2-4** présente la teneur en divers éléments des épis à la floraison, dans les différents systèmes de culture (en 2002-03). Le système intégré se distingue des autres systèmes par des teneurs plus fortes en phosphore et en potassium, tandis que ses teneurs en glucides sont souvent plus faibles. Cette différence d'un système à l'autre s'estompant très largement à la récolte, il est probable qu'à la floraison elle résulte essentiellement d'une migration plus tardive de ces éléments dans la plante. Le système biologique se révèle avoir une nutrition azotée plus faible et des taux en glucides plus élevés que les autres systèmes. Les systèmes conventionnel et sans travail du sol avec couverture permanente présentent souvent des teneurs intermédiaires en éléments minéraux.

#### ***Caractérisation des attaques de maladies***

En 2001-02 et 2002-03, pas plus de 3% en 2001-02 et 7% en 2002-03 des bas de tige ont présenté des symptômes de piétin verse sur les parcelles. Des symptômes de rouille brune ont pu être observés sur quatre parcelles en 2001-02 et sur deux parcelles en 2002-03, mais sur moins de 10% de la surface des feuilles l'une et l'autre année. La septoriose a été repérée sur l'ensemble des parcelles, couvrant en 2001-02 moins de 25% de la surface des trois dernières feuilles, et en 2002-03 moins de 15%. Les gammes d'intensité d'attaque de fusariose de bas de tige et de tige sont quant à elles très étendues (jusqu'à 44% en 2001-02 et 60% en 2002-03, **Figure 5-2-1**), mais, comme sur le réseau précédemment décrit, ces intensités de fusariose sur bas de tige ou sur tige ne sont pas finement corrélées avec les symptômes de fusariose de l'épi dont on parlera plus loin (même si on a l'impression qu'une tendance se dégage en 2002-03). Le système biologique paraît moins affecté par les maladies que les autres systèmes.

#### ***Composantes du rendement et teneur en protéines***

Le **Tableau 5-2-5** présente les différentes composantes du rendement de la récolte des grains. Nous observons que la teneur en protéines des grains est plus élevée lors de l'année 2002-03 que lors de l'année précédente, probablement en raison d'une durée réduite de remplissage. Nous constatons également que le nombre de grains par m<sup>2</sup> et le poids moyen d'un grain sont plus faibles en 2002-03 qu'en 2001-02. Le système biologique se caractérise par un plus petit nombre de grains par m<sup>2</sup> (et donc un rendement plus faible) que les autres systèmes, et notamment que le système conventionnel qui présente -comme on pouvait s'y attendre- le nombre de grains par m<sup>2</sup> le plus élevé ( $\alpha < 0,05$ ). Sur l'ensemble des systèmes de culture, la conduite "contrôle" (avec la variété *Charger*) permet de constater que des deux composantes du rendement (poids d'un grain et nombre de grains par m<sup>2</sup>), c'est le nombre de grains par m<sup>2</sup> qui est le plus limitant dans l'établissement du rendement (**Tableau 5-2-5**). La teneur en protéines des grains est, là encore, légèrement plus faible en système biologique que dans les autres systèmes ( $\alpha < 0,001$ ).

## **2.2- Caractérisation des niveaux d'attaque et de contamination dans l'essai systèmes**

En quatre années d'étude, seules trois mycotoxines fusariennes ont été retrouvées sur cet essai (**Tableau 5-2-6**) : déoxynivalénol et nivalénol (comme sur le réseau de parcelles agricoles), et aussi zéaralénone (lors des deux premières années d'étude, en 1999-00 et 2000-01). Si on compare ces résultats avec ceux du **Tableau 5-1-10**, on voit qu'en 2002-03, les niveaux d'attaque (intensité ou gravité) et les teneurs en nivalénol sont en moyenne plus importants sur les parcelles de l'essai que sur les parcelles du réseau, mais leur dispersion est comparable. En revanche, en 2001-02, ces paramètres, de même que les teneurs en déoxynivalénol, ne sont pas significativement différents sur les deux dispositifs.

Sur l'ensemble des quatre années, les niveaux d'attaque des épis et de contamination des grains sont inférieurs à ceux généralement décrits dans la littérature (et rappelés au paragraphe 1.1.4 de ce chapitre). L'analyse des résultats de ces quatre années montre que les niveaux d'intensité d'attaque de 2002-03, élevés, ont été malgré tout similaires à ceux de 1999-2000 ( $\alpha < 0,001$ ). Cependant, 2002-

**Tableau 5-2-6 : Niveaux d'attaque et de contamination en mycotoxines des parcelles de l'essai systèmes (1999-00, 2000-01, 2001-02 et 2002-03)**

a- Conduites cohérentes

Année	Système de culture	Bloc	Intensité	Gravité	Zéaralénone, µg/kg	Nivalénol, µg/kg	Déoxynivalénol, µg/kg
<b>Systèmes cohérents (variété et traitements fongicides cohérents)</b>							
1999-00	Conventionnel	I	47%	24%	60	<d <sub>l</sub>	1230
		II	46%	23%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	860
	Intégré	I	24%	6%	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	430
		II	20%	8%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	270
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	67%	34%	390	120	7420
		II	66%	38%	330	<q <sub>l</sub>	9100
Biologique	I	13%	5%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	230	
	II	35%	22%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	350	
2000-01	Conventionnel	I	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	120
		II	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Intégré	I	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
		II	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	-	-	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
		II	-	-	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
Biologique	I	0%	0%	<d <sub>l</sub>	100	430	
	II	0%	0%	<d <sub>l</sub>	60	370	
2001-02	Conventionnel	I	26%	3%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	150
		II	13%	1%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	380
	Intégré	I	2%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
		II	3%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	280
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	17%	1%	<d <sub>l</sub>	80	400
		II	3%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	600
Biologique	I	1%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	100	
	II	1%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	110	
2002-03	Conventionnel	I	66%	9%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	190
		II	32%	4%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	250
	Intégré	I	36%	4%	<d <sub>l</sub>	80	650
		II	40%	4%	<d <sub>l</sub>	70	380
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	10%	3%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	600
		II	30%	5%	<d <sub>l</sub>	70	700
Biologique	I	12%	1%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	110	
	II	12%	1%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	
<b>Autre variété cohérente : (variété <i>Renan</i>, souvent "choisie" par les agriculteurs)</b>							
2001-02	Biologique	I	2%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	140
		II	3%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	240
2002-03	Biologique	I	4%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	60
		II	8%	1%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>

<d<sub>l</sub> teneur en mycotoxine inférieure à la limite de détection (30 µg/kg) ; <q<sub>l</sub> teneur en mycotoxine inférieure à la limite de quantification (60 µg/kg), - non déterminé.

En bleu, les deux plus fortes valeurs de chaque colonne par année. En vert les deux plus faibles valeurs de chaque colonne par année.

03 n'a connu ni la gravité d'attaque, ni les niveaux de contamination en mycotoxines fusariennes rencontrés en 1999-00 : les niveaux de gravité d'attaque et les teneurs en zéaralénone et en déoxynivalénol sont significativement plus élevés en 1999-00 que lors des trois autres années ( $\alpha < 0,001$ ). Parmi les variables climatiques décrites au paragraphe 1.3.1 de ce chapitre, celle qui permet le mieux de distinguer les quatre années est le cumul des précipitations entre la floraison et la récolte des parcelles : sur cette période, les parcelles ont reçu en moyenne une pluviométrie de 240 mm en 1999-00, contre 205 mm en 2000-01, 103 mm en 2001-02 et seulement 64 mm en 2002-03. L'année 1999-00, qui présente des niveaux d'attaque et de contamination particulièrement élevés, est donc celle qui présente la pluviométrie la plus importante. Ceci est conforme aux résultats publiés dans la littérature, même si la littérature privilégie la période de floraison, mais en désaccord avec certains des résultats obtenus sur notre réseau, où les attaques augmentaient bien avec les précipitations mais les contaminations en déoxynivalénol diminuaient avec les précipitations.

Tous types de conduites confondus, **les quatre plus forts taux de déoxynivalénol** (entre 4000 et 9100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) **sont observés pour un même système de culture : celui sans travail du sol avec couverture permanente**, en 1999-00. Cette même année, les autres systèmes n'ont pas présenté de niveaux de contamination particulièrement importants : seules deux autres parcelles (du système de culture conventionnel) ont présenté un niveau de contamination supérieur à 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de déoxynivalénol. L'année suivante, en 2000-01, la contamination en déoxynivalénol des parcelles cultivées en système sans travail du sol avec couverture permanente et biologique avec la variété *Charger* a également été supérieure à 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La même tendance est observée pour les niveaux d'attaque. Ces constats soulignent l'importance des systèmes de culture sur les niveaux d'attaque et de contamination.

De même que dans le réseau de parcelles agricoles, on ne note pas de corrélation stricte entre (i) l'intensité et la gravité des attaques (données non montrées) et (ii) les niveaux de contamination des grains par déoxynivalénol/nivalénol et les niveaux d'attaque des épis (qu'ils soient évalués en termes de gravité ou en termes d'intensité, **Figure 5-2-2**).

## **2.3- Effets des systèmes de culture dans l'essai systèmes**

### **2.3.1- Effets de quelques pratiques culturales particulières**

L'essai de longue durée permettant de compléter l'étude faite sur le réseau de parcelles agricoles, nous revenons initialement sur trois pratiques culturales peu étudiées sur le réseau (le travail du sol, la variété et les traitements fongicides), avant d'analyser les effets des systèmes de culture sur quatre ans et de synthétiser ces résultats avec ceux du réseau de parcelles agricoles.

#### ***Effets du travail du sol***

Deux pratiques culturales différencient le système intégré et le système sans travail du sol avec couverture permanente : dans le premier, un travail du sol est effectué tous les ans (dont un labour tous les deux ans), tandis que dans le deuxième, aucun travail du sol n'est réalisé et une couverture végétale est présente en permanence. La comparaison de ces systèmes permet donc d'observer les effets résultant de ces différences de conduite. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 5-2-7** : le système sans travail du sol avec couverture permanente a présenté des niveaux d'attaque des épis supérieurs à ceux du système intégré (dont le sol était labouré) pendant les trois années où les deux systèmes ont été étudiés ( $\alpha < 0,05$  sur la gravité et l'intensité des attaques), mais pas pour l'année 2002-03, où un résultat inverse a été noté. L'inversion des résultats en 2002-03 pourrait résulter de l'interaction entre les effets du travail du sol et de la protection fongicide. En effet, l'année 2002-03 se caractérise, par rapport aux autres années, par l'absence de protection fongicide.

b- Autres types de conduites

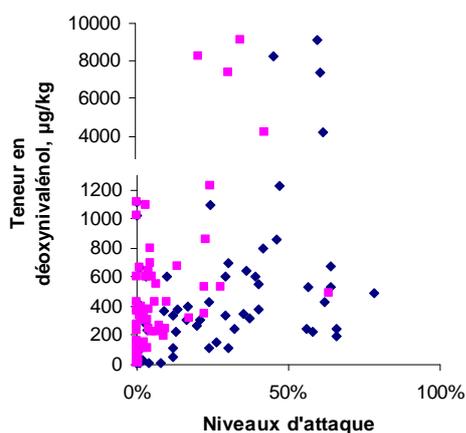
Année	Système de culture	Bloc	Intensité	Gravité	Zéaralénone, µg/kg	NivalénoI, µg/kg	DéoxynivalénoI, µg/kg
<b>Systèmes contrôle (variété <i>Charger</i> sans traitement fongicide)</b>							
1999-00	Conventionnel	I	78%	63%	140	<d <sub>1</sub>	490
		II	57%	22%	140	<d <sub>1</sub>	530
	Intégré	I	64%	28%	<q <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	530
		II	37%	17%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	320
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	68%	47%	450	90	4230
		II	50%	23%	770	90	8220
Biologique	I	9%	2%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	370	
	II	1%	1%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	670	
2000-01	Conventionnel	I	0%	0%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>
		II	0%	0%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	60
	Intégré	I	0%	0%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>
		II	0%	0%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	160
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	-	-	-	-	-
		II	-	-	-	-	-
Biologique	I	0%	0%	<d <sub>1</sub>	320	1120	
	II	0%	0%	70	370	1020	
2001-02	Conventionnel	I	21%	4%	<d <sub>1</sub>	<q <sub>1</sub>	310
		II	12%	1%	<d <sub>1</sub>	<q <sub>1</sub>	340
	Intégré	I	16%	2%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	310
		II	29%	2%	<d <sub>1</sub>	80	340
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	41%	5%	<d <sub>1</sub>	90	800
		II	24%	3%	<d <sub>1</sub>	80	1100
Biologique	I	39%	5%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	600	
	II	29%	3%	<d <sub>1</sub>	60	600	
2002-03	Conventionnel	I	66%	9%	<d <sub>1</sub>	120	250
		II	56%	8%	<d <sub>1</sub>	<q <sub>1</sub>	250
	Intégré	I	62%	10%	<d <sub>1</sub>	80	430
		II	58%	7%	<d <sub>1</sub>	80	230
	Sans travail du sol avec couverture permanente	I	40%	6%	<d <sub>1</sub>	80	550
		II	64%	13%	<d <sub>1</sub>	140	680
Biologique	I	30%	3%	<d <sub>1</sub>	<q <sub>1</sub>	110	
	II	24%	2%	<d <sub>1</sub>	70	110	
<b>Autre système : essai variété (<i>Apache</i>)</b>							
2001-02	Intégré	I	0%	0%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>
		II	1%	0%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>

< d<sub>1</sub> teneur en mycotoxine inférieure à la limite de détection (30 µg/kg), <q<sub>1</sub> teneur en mycotoxine inférieure à la limite de quantification (60 µg/kg), - non déterminé

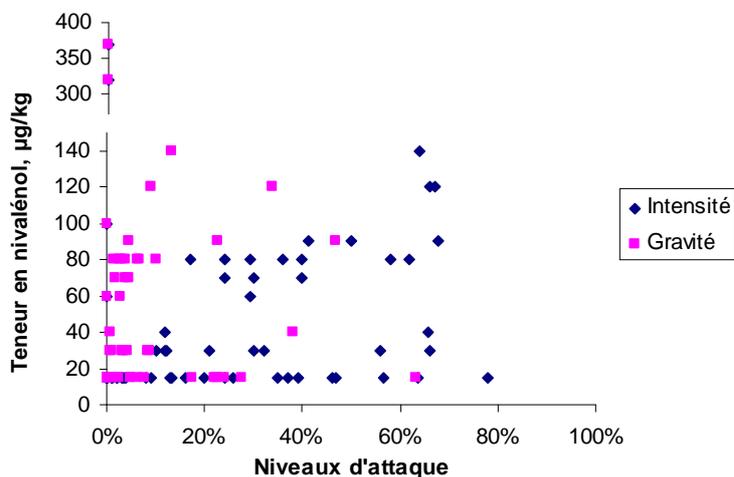
En bleu (respectivement vert) les deux plus fortes (respectivement faibles) valeurs de chaque colonne par année.

**Figure 5-2-2 : Relation entre les niveaux d'attaque et les niveaux de contamination des parcelles de l'essai au cours des quatre années d'étude**

a- Contamination par déoxynivalénol



b- Contamination par nivalénol



**Tableau 5-2-7 : Effet du travail du sol sur les niveaux d'attaque et de contamination**

Année	Système de culture – travail du sol <sup>a</sup>	Intensité	Gravité	Teneur en nivalénol, µg/kg	Teneur en déoxynivalénol, µg/kg
<b>Systèmes cohérents (variétés et traitements fongicides cohérents)</b>					
1999-00	Intégré – travail du sol superficiel	22%	7%	<d <sub>l</sub>	350
	Sans travail du sol avec couverture permanente	66%	36%	80	8260
2000-01	Intégré – travail du sol superficiel	0%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	Sans travail du sol avec couverture permanente	-	-	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
2001-02	Intégré – travail du sol superficiel	3%	0%	<d <sub>l</sub>	160
	Sans travail du sol avec couverture permanente	10%	1%	<q <sub>l</sub>	500
2002-03	Intégré – travail du sol superficiel <sup>a</sup>	38%	4%	80	520
	Sans travail du sol avec couverture permanente <sup>a</sup>	20%	4%	<q <sub>l</sub>	650
<b>Systèmes contrôle (variété <i>Charger</i> sans fongicide)</b>					
1999-00	Intégré – travail du sol superficiel	50%	23%	<d <sub>l</sub>	420
	Sans travail du sol avec couverture permanente	59%	35%	90	6230
2000-01	Intégré – travail du sol superficiel	0%	0%	<d <sub>l</sub>	80
	Sans travail du sol avec couverture permanente	-	-	-	-
2001-02	Intégré – travail du sol superficiel	23%	2%	40	330
	Sans travail du sol avec couverture permanente	32%	4%	90	950
2002-03	Intégré – travail du sol superficiel	60%	8%	80	330
	Sans travail du sol avec couverture permanente	52%	10%	130	650

- non déterminé. <sup>a</sup> Aucun traitement fongicide pour lutter contre la fusariose.

**Tableau 5-2-8 : Effet de la variété cultivée sur les niveaux d'attaque et de contamination**

Système de culture	Année	Variété *	Intensité	Gravité	Teneur en nivalénol, µg/kg	Teneur en déoxynivalénol, µg/kg
Intégré	2001-02	Apache **	1%	0%	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
		Mélange SMAV **	3%	0%	<d <sub>l</sub>	160
	2002-03	Charger	60%	8%	80	330
		Mélange VMAC	38%	4%	80	520
Sans travail du sol	2002-03	Charger	52%	10%	130	650
		Mélange VMAC	20%	4%	<q <sub>l</sub>	650
Biologique	1999-00	Charger	5%	2%	<d <sub>l</sub>	520
		Mélange SMRCr	24%	14%	<d <sub>l</sub>	290
	2000-01	Charger	0%	0%	350	1070
		Mélange CVRP	0%	0%	80	400
	2001-02	Charger	34%	4%	<q <sub>l</sub>	600
		Apache	1%	0%	<d <sub>l</sub>	110
		Renan	3%	0%	<d <sub>l</sub>	190
	2002-03	Charger	27%	3%	<q <sub>l</sub>	110
		Apache	12%	1%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
		Renan	6%	0%	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>

Mélange de variétés (25% de chaque) : SMAV, *Somme*, *Malacca*, *Apache* et *Virtuose* ; VMAC, *Virtuose*, *Malacca*, *Apache* et *Charger* ; SMRCr, *Somme*, *Malacca*, *Renan* et *Camp-Remy* ; CVRP, *Charger*, *Virtuose*, *Renan* et *Paindor*. Un classement des résistances à la fusariose des variétés cultivées sur le réseau est présenté en **Annexe 1**.

\*, conduites sans traitements fongicides en général, sauf pour \*\*

Comme les parcelles du réseau, les parcelles non labourées de l'essai systèmes sont également plus contaminées en déoxynivalénol que les parcelles labourées ( $\alpha < 0,01$ , **Tableau 5-2-7**). Les contaminations par le nivalénol sont plus variables, mais les parcelles non labourées présentent tout de même une contamination légèrement plus importante que les parcelles labourées ( $\alpha < 0,01$ , **Tableau 5-2-7**).

Notons qu'en 1999-00, le blé du système intégré suivait une culture de colza alors que le blé du système sans travail du sol suivait une culture mixte (maïs sur fétuque). Or, la culture de blé derrière un maïs non labouré est la situation qui est réputée maximiser la contamination en mycotoxines fusariennes. L'effet particulièrement important en 1999-00 de l'absence de travail du sol sur la contamination en déoxynivalénol doit donc probablement être en fait attribué à une interaction de pratiques, absence de travail du sol et maïs en culture précédente : de nouveau, les effets du travail du sol sont couplés à ceux du précédent cultural.

Ces résultats sont conformes à ceux que l'on peut trouver dans la littérature pour les effets du travail du sol, seul ou en interaction avec un précédent cultural de maïs, sur les niveaux de maladie et de contamination en déoxynivalénol. Pour les effets sur nivalénol, nous ne connaissons pas d'étude publiée présentant ce genre de résultats ; une étude non publiée suggère l'absence d'effet systématique du travail du sol sur cette contamination (Ioos, *com. pers.*).

#### **Effets du choix de la variété de blé**

En 2002-03, dans le système intégré et le système sans travail du sol avec couverture permanente, rien (en particulier aucun traitement fongicide) n'a distingué les parcelles semées avec la variété *Charger* des autres parcelles semées avec le mélange variétal "VMAC" (*Virtuose, Malacca, Apache* et *Charger*). Au vu des symptômes, la variété *Charger* a été plus intensément et gravement attaquée que le mélange variétal ( $\alpha < 0,05$ , **Tableau 5-2-8**) ; mais ceci n'a eu aucune répercussion sur la contamination des grains en déoxynivalénol ou en nivalénol (**Tableau 5-2-8**).

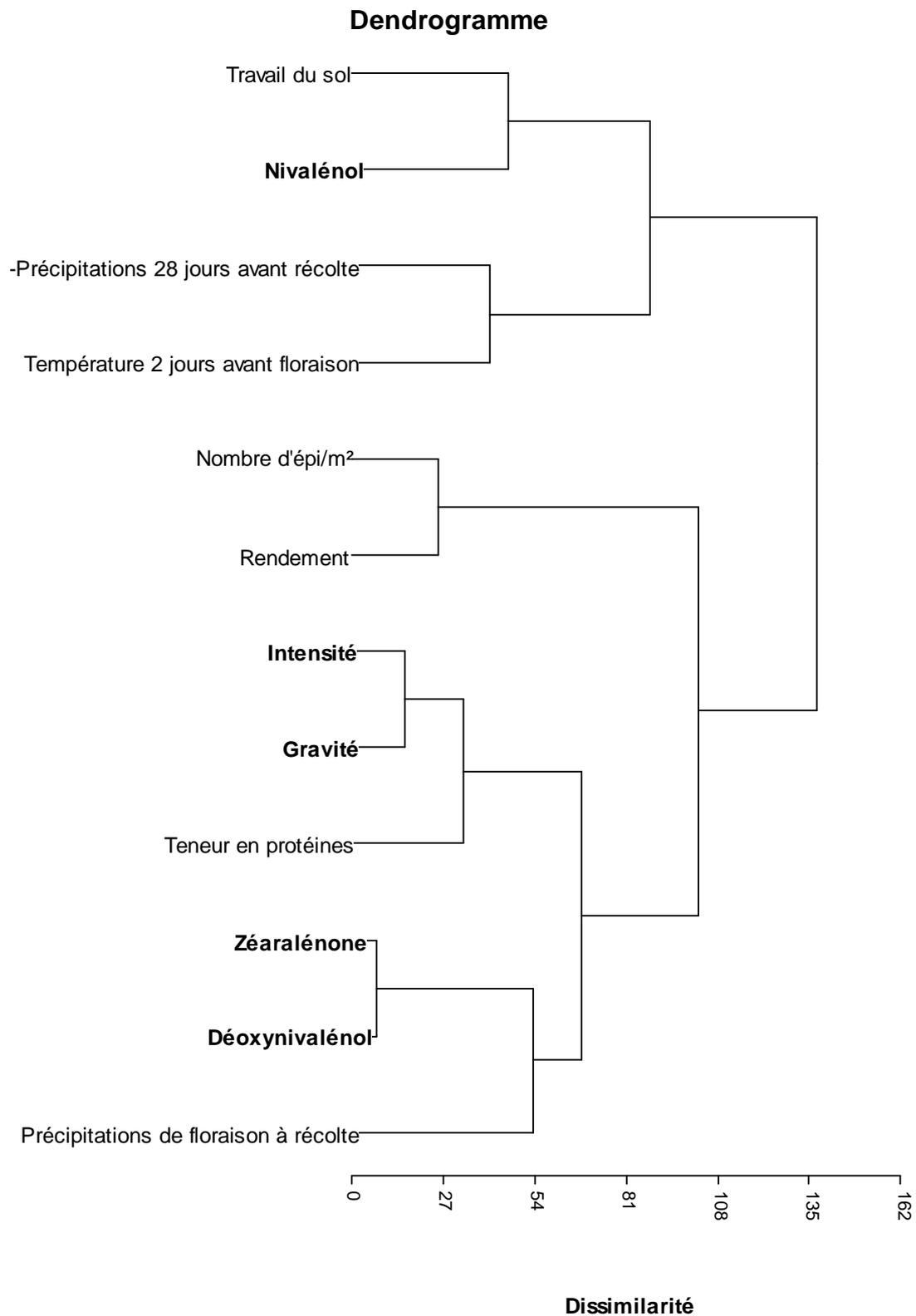
Le système biologique, quant à lui, permet de comparer la variété *Charger* au mélange SMRCr en 1999-00 (*Somme, Malacca, Renan* et *Camp-Remy*), au mélange CVRP en 2000-01 (*Charger, Virtuose, Renan* et *Paindor*), et enfin aux variétés *Apache* et *Renan* (les deux dernières années). En ce qui concerne les symptômes d'attaque, *Charger* est plutôt moins attaqué (en intensité comme en gravité) que le mélange SMRCr en 1999-00, mais davantage que *Apache* et *Renan* en 2002-03 ( $\alpha < 0,001$ ) (aucune conclusion ne peut être tirée de l'expérience de 2000-01, en raison de la trop grande faiblesse des symptômes) ; la variété *Apache* est elle-même plus attaquée que *Renan* en 2002-03 (**Tableau 5-2-8**), mais en terme de gravité d'attaque, les niveaux étant très bas, le classement n'est agronomiquement pas significatif. En ce qui concerne les contaminations en mycotoxines, *Charger* est toujours plus contaminé que les mélanges, ou que les variétés *Apache* et *Renan* (**Tableau 5-2-8**).

#### **Effets des traitements fongicides**

L'effet de l'absence d'un traitement fongicide a pu être analysé grâce aux données recueillies pendant les quatre années de l'étude sur les parcelles cultivées en "conditions contrôle" en système conventionnel (**Tableau 5-2-6**). En système conventionnel, l'absence de fongicides (strobilurines seules en 1999-00 ou mélange strobilurines/triazoles en 2000-01, 2001-02 et 2002-03 s'est en général (sauf pour l'intensité d'attaque en 2001-02) accompagnée d'une plus forte intensité et gravité d'attaque.

Sur ces parcelles, en plus du déoxynivalénol, on a, selon l'année, pu détecter deux autres toxines : zéaralénone en 1999-00 et nivalénol en 2002-03. Pour ces deux dernières toxines, les conduites "cohérentes", c'est-à-dire avec des fongicides (respectivement à base de strobilurines seules en 1999-

**Figure 5-2-3 : Classification hiérarchique des variables, sur les parcelles de l'essai système**  
a- Sur toutes les années



00, ou à base de strobilurines et triazoles associés les trois autres années), ont donné lieu à des contaminations significativement inférieures ( $\alpha < 0,05$  et  $\alpha < 0,001$  respectivement). Pour le déoxynivalénol, cependant, les conduites cohérentes (avec fongicides), ont donné lieu à des contaminations tantôt moins importantes (en 2001-02 et 2002-03), tantôt plus importantes (1999-00 et 2000-01), mais l'effet n'est significatif dans aucun des deux cas. De façon globale les traitements fongicides à base de strobilurines seulement (en 1999-00) ou de strobilurines et triazoles (sur les trois autres années) n'assurent donc pas une réelle efficacité que ce soit pour diminuer les niveaux d'attaque ou pour diminuer les niveaux de contamination. L'inconstance de cet effet pourrait résulter de la variabilité des populations de pathogènes infectantes (cf. article présenté à la fin de cette partie 2 du chapitre 5).

### 2.2.1- Effets des systèmes de culture

Une première publication sur l'effet des systèmes de culture dans notre essai systèmes après trois ans d'étude a été publiée dans *Crop Protection*. Elle est présentée un peu plus loin, mais ses conclusions, qui vont être résumées maintenant, ne sont pas remises en cause par les résultats de la quatrième année de culture.

Sur l'ensemble des quatre années pour lesquelles les données sont donc maintenant disponibles (**Tableau 5-2-6**), il apparaît que les résultats (en terme d'impact de la fusariose) sont très liés à l'année de la culture (il y a une très forte "interaction" entre le système de culture et l'année), alors qu'ils ne dépendent que peu du fait que la culture soit conduite de façon "cohérente" ou non ("contrôle").

L'année 1999-00 est la plus attaquée et la plus contaminée des quatre années ( $\alpha < 0,001$ ), et, parmi les deux types de conduites (**Tableau 5-2-6a**), c'est le système sans travail du sol avec couverture permanente qui est le plus contaminé en toxines : on y trouve significativement plus de zéaralénone, de nivalénol et de déoxynivalénol que dans les autres systèmes ( $\alpha < 0,001$ ), et les symptômes de fusariose y sont aussi plus intenses et plus graves que dans les autres systèmes en conduite cohérente. Vient ensuite le système conventionnel (de nouveau à la fois du point de vue des toxines et des symptômes). Viennent enfin plus ou moins ensemble le système intégré et le système biologique.

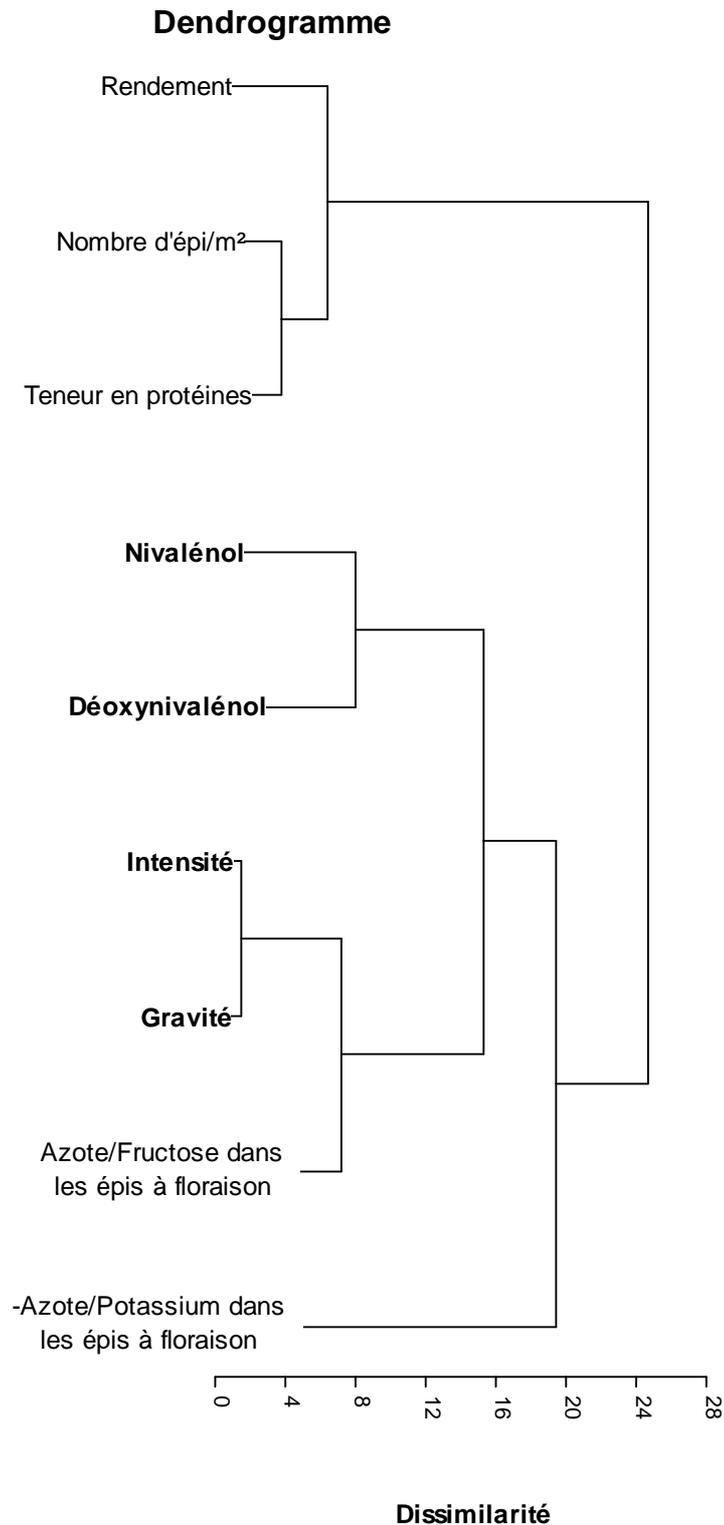
Sur l'ensemble des quatre années, le système sans travail du sol reste, souvent de loin, le plus contaminé des systèmes en zéaralénone, en nivalénol et/ou déoxynivalénol ( $\alpha < 0,05$ ). On retrouve de nouveau le système conventionnel (productif), lui-même plus contaminé en déoxynivalénol que les systèmes biologique et intégré. Mais on ne trouve plus guère d'effet du système de culture sur les attaques de fusariose, évaluée en terme d'intensité, et plus du tout si cette évaluation est faite en termes de gravité. La tendance est cependant que ce soit le système biologique qui soit le moins atteint par les symptômes visibles de fusariose.

#### **Diagnostic agronomique global**

Une hiérarchisation des pratiques culturales, des états du couvert, du climat et des variables de la fusariose (attaque et contamination) dans notre essai système aboutit finalement à des dendrogrammes caractéristiques :

- sur l'ensemble des années (**Figure 5-2-3a**), les symptômes de la maladie y sont reliés d'abord à la teneur en protéines des grains (c'est-à-dire au contenu azoté des grains), puis à la production de déoxynivalénol et de zéaralénone, alors que densité du peuplement et rendement de la culture sont situés sur des branches plus éloignées du dendrogramme. La production de nivalénol, elle, est reliée d'abord à la température moyenne pendant les deux jours précédant la floraison est proche, puis à l'absence de travail du sol. Les précipitations sont sur une branche indépendante,

b- Sur 2002-03



Le signe - rend compte d'un sens de variation négatif d'une variable quantitative (rapport azote potassium dans les épis à la floraison) dans cette classification.

Les parcelles étant toutes soumises à un même climat en 2002-03, les variables climatiques n'apparaissent pas sur le dendrogramme b. Pas de zéaralénone en 2002-03.

- sur l'année 2002-03 (**Figure 5-2-3b**), où la nutrition des épis à la floraison a été également caractérisée, les variables dites de nutrition et précédemment identifiées dans le réseau (ratio du taux d'azote sur celui de fructose et du taux d'azote sur celui de potassium) ont une proximité remarquable, donc une liaison significative, avec les paramètres d'attaque des épis et de production de toxines.

*Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat*

Publié dans *Crop Protection* en 2004.



# Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat

A. Champeil<sup>a,\*</sup>, J.F. Fourbet<sup>a</sup>, T. Doré<sup>a</sup>, L. Rossignol<sup>b</sup>

<sup>a</sup>UMR d'Agronomie INRA/INA P-G, Centre INRA Versailles—Grignon, 78850 Thiverval—Grignon, France

<sup>b</sup>Direction Scientifique de la Nutrition Humaine et de la sécurité des Aliments, INRA, 147 rue de l'Université, 75 007 Paris, France

Received 23 May 2003; received in revised form 13 August 2003; accepted 17 October 2003

## Abstract

In this study, we investigated the effects of various wheat cropping systems on *Fusarium* head blight severity and mycotoxin (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone) levels. We investigated four wheat-cropping systems: a conventional system, an integrated system, a direct drilling system and an organic system, in fields with natural contamination. The study was carried out over three 1-year periods: 1999–2000, 2000–2001 and 2001–2002. The severity of *Fusarium* head blight and toxin levels differed considerably between years, reflecting climatic effects. In a given year, the severity of *Fusarium* head blight also differed between cropping systems, with the most severe disease observed in the direct drilling and conventional system plots in 2000. The level of grain contamination by mycotoxins therefore depends on both climate and cropping system. Mycotoxin levels were highest in the year with the highest disease severity: 2000. Contamination levels were highest with the direct drilling system. We were unable to rank the organic and conventional systems, because neither was consistently more contaminated than the other. Moreover, no clear relationship was found between disease severity and levels of contamination with deoxynivalenol, nivalenol or zearalenone under conditions of natural contamination.

©2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Cropping systems; Mycotoxins; Deoxynivalenol (DON); *Fusarium*; *Fusarium* head blight; Wheat

## 1. Introduction

In recent years, the food industry has been faced with several major health crises. This has led to an increase in public concern about food safety. Several mycotoxins cause major safety problems in cereal production (Le Boulc'h et al., 2000). The ingestion of mycotoxins may result in vomiting, reproductive disturbances, leukoencephalomalacia, pulmonary oedema, impairment of the humoral and cellular immune responses, nervous disorders, myocardial hypertrophy and several cancers (Placinta et al., 1999). Some of these toxins are produced before harvest (trichothecenes, fumonisins and zearalenone), whereas others are produced after harvest (ochratoxin A and aflatoxins). Several species of *Fusarium* are responsible for toxin production before

harvest (Maurin and Chenet, 1993). These fungi, together with *Microdochium*, are responsible for *Fusarium* head blight, or scab (Cassini, 1970; Ban, 2000). As the deleterious effects of this disease include yield losses of up to 50% (Atanasoff, 1920; Parry et al., 1995) and the production of various mycotoxins: zearalenone, deoxynivalenol and derivatives, nivalenol, T<sub>2</sub>-toxin, HT<sub>2</sub>-toxin and other toxins (Placinta et al., 1999). Climate is thought to be a key determinant of *Fusarium* head blight (Langseth et al., 1995; Lacey et al., 1999). However, in a given year, neighbouring fields may display different levels of contamination: the cropping system may therefore affect the level of mycotoxin production by *Fusarium*. The use of fungicides during growth of the wheat crop does not guarantee the absence of toxins in the harvested grain. The entire cropping system must be considered. Several studies have demonstrated effects of soil tillage (Teich and Hamilton, 1985; Dill-Macky and Jones, 2000), preceding crop (Teich and Nelson, 1984; Dill-Macky and Jones, 2000) and wheat genotype (Mesterhazy, 1983;

\*Corresponding author. Fax: +33-1308-15425.

E-mail addresses: champeil@grignon.inra.fr (A. Champeil), fourbet@grignon.inra.fr (J.F. Fourbet), dore@inapg.inra.fr (T. Doré), lrossignol@ania.net (L. Rossignol).

Teich and Hamilton, 1985; Snijders, 1990; Dill-Macky and Jones, 2000) on scab development and/or mycotoxin contamination. However, few studies have analysed both disease severity and mycotoxin contamination. There is also a lack of studies comparing the effects of entire cropping systems rather than aspects of crop management. The aim of this study was to investigate the effects of four cropping systems (conventional, integrated, direct drilling and organic systems) on *Fusarium* head blight severity and on levels of several mycotoxins in grains. We also tried to correlate both disease severity and levels of contamination with deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels under conditions of natural contamination.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental design

Since 1997, the four cropping systems (conventional, integrated, direct drilling and organic) were compared using “crop X—wheat—crop Y—wheat” crop rotations. We assigned two large plots (0.5 ha each) to each cropping system. Each plot was divided in half. On each half (subplot), we organised the rotation such that there was one wheat crop every year on each plot. The conventional system corresponded to intensive agriculture, in which the aim is to achieve the highest net income by maximising yield. The integrated system, in which input levels (and yields) were lower, aimed to maximise net income whilst preserving the environment. In the direct drilling system, crops had been planted without soil tillage and permanent vegetation cover (fescue) had been maintained since 1998–1999. We evaluated this system as an alternative to the integrated system, aiming to achieve the same objectives. No chemical inputs were used in the organic system. Each cropping system was defined in terms of a specific combination of technical choices, each closely related to the others. For example, the choice of cultivar depended on whether a fungicide was to be used. Thus, the cropping systems differed in several aspects: cultivar, tillage, chemical treatments, nitrogen fertilisation, time and density of sowing, and crop sequence. Furthermore, the techniques used within a given cropping system were prone to change from year to year, and depended on climate in particular. As part of a larger study, we compared the agronomic, environmental and economic aspects of the various systems (results not shown). We began to study *Fusarium* head blight in these experimental plots in 1999/2000. We set up additional treatments in each system to enable us to increase our understanding of the determinants of pathogen attack: the Charger cultivar (the cultivar used in the conventional system) was cropped without fungicide in a subplot of each system.

Over the 3-year study period, the preceding crop and fungicide treatment changed each year for each system. In 1999–2000, the fungicide treatments used contained strobularins, whereas in 2000–2001 and 2001–2002, a mixture of strobularins and triazoles was used. Each system remained internally consistent from year to year and the technical details of each system are presented in Table 1. In 2000–2001, sowing conditions were extremely difficult for the direct drilling system due to large amounts of crop residue on the soil surface and high moisture levels in the seedbed (high rainfall during autumn). This led to poor emergence of the wheat crop in this system. We therefore took no samples from the direct drilling system in 2000–2001.

### 2.2. Evaluation of kernel infection by head blight

For each cropping system (and each subplot), we used four randomly selected samples of 25 heads to determine disease severity, every week between flowering and physiological maturity of the grain. Disease severity was estimated by determining the percentage of spikelets per head for which at least one third of the external surface of glumes presented symptoms of head blight.

### 2.3. Mycotoxin extraction and analysis

We determined the mycotoxin content of grains from plants sampled at harvest. Plant sampling was based on the 98/53/CE directive, which lays down the sampling procedure for official controls of aflatoxin level. We used this directive as there is no similar text dealing with *Fusarium* toxins. According to this directive, for plots with yields lower than 1 t, 10 samples of 100 g must be harvested and pooled to give a total sample of 1 kg. We collected 1 kg grain samples in this manner from each plot. Samples were dried (48 h–80 °C) and sent to Qualtech (Vandoeuvre-les-Nancy, France) for testing. In the first 2 years, we determined the levels of the following mycotoxins: zearalenone, groups A and B trichothecenes (diacetoxyscirpenol (DAS), T-2, HT-2, nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON) and derivatives (3-aDON and 15-aDON), fusarenone (FUX), and fumonisins B1 and B2. In the final year, we determined levels of zearalenone, groups A and B trichothécènes (diacetoxyscirpenol (DAS), monoacetoxyscirpenol (MAS), T-2, HT-2, neosolaniol, T2-triol, nivalénol (NIV), deoxynivalenol (DON) and derivatives (3-aDON and 15-aDON), and fusarenone (FUX). Zearalenone levels were determined with an immunoaffinity high-performance liquid chromatography (HPLC) method, validated by the French norm NF V03-110. Fumonisines were determined by HPLC, and trichothecenes by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS), validated by the French norm NF EN ISO/CEI 17025.

Table 1  
Principal traits of the four adapted cropping systems over the 3 years

Adapted system	Sowing time	Flowering time	Harvest time	Nitrogen (kg/ha)	Seed rate (seeds/m <sup>2</sup> )	Fungicide treatment	Cultivar	Previous crop
(a) Mixture 1: Somme, Malacca, Renan, Camp Remy; Mixture 2: Somme, Malacca, Virtuose, Apache; Mixture 3: Charger, Virtuose, Renan, Painsdor								
Conventional	11/10/99	23/05/00	03/08/00	247	260	Strobularins (azoxystrobin)	Charger	Oilseed rape
Integrated	27/10/99	25/05/00	03/08/00	197	165		Mixture 1	Oilseed rape
Direct drilling	27/10/99	25/05/00	03/08/00	197	220		Mixture 1	Maize with fescue
Organic	10/11/99	30/05/00	03/08/00	0	450	None	Mixture 1	Oilseed rape
Conventional	04/10/00	28/05/01	30/07/01	249	260	Mixture of strobularins (azoxystrobin), triazoles (tebuconazole), prochloraze, cyprodinil	Charger	Oilseed rape
Integrated	24/10/00	01/06/01	30/07/01	201	165	Strobularins	Mixture 1	Oilseed rape
Direct drilling	25/10/00	01/06/01	30/07/01	167	220	(azoxystrobin), cyprodinil	Mixture 1	Maize with fescue
Organic	17/01/01	27/06/01	30/07/01	0	450	None	Mixture 3	Spring lupin
Conventional	05/10/01	06/06/02	29/07/02	208	260	Mixture of strobularins (azoxystrobin), triazoles (fluquinconazole), epoxinazole, prochloraze	Charger	Pea
Integrated	17/10/01	23/05/02	30/07/02	131	165	Mixture of strobularins (azoxystrobin), triazoles (epoxinazole)	Mixture 2	Pea
Direct drilling	26/10/01	25/05/02	30/07/02	141	220		Mixture 2	Pea
Organic	31/10/01	23/05/02	30/07/02	54	450	None	Apache	Pea
(b) No fungicide treatment, cultivar Charger								
Subsystem	Sowing time	Flowering time	Harvest time	Nitrogen (kg/ha)	Seed rate (seeds/m <sup>2</sup> )	Fungicide treatment	Cultivar	Previous crop
Conventional	11/10/99	23/05/00	03/08/00	247	260	None	Charger	Oilseed rape
Integrated	27/10/99	25/05/00	03/08/00	197	165	None	Charger	Oilseed rape
Direct drilling	27/10/99	25/05/00	03/08/00	197	220	None	Charger	Maize with fescue
Organic	10/11/99	30/05/00	03/08/00	0	450	None	Charger	Oilseed rape
Conventional	04/10/00	28/05/01	30/07/01	249	260	None	Charger	Oilseed rape
Integrated	24/10/00	01/06/01	30/07/01	201	165	None	Charger	Oilseed rape
Organic	17/01/01	27/06/01	30/07/01	0	450	None	Charger	Spring lupin
Conventional	05/10/01	06/06/02	29/07/02	208	260	None	Charger	Pea
Integrated	17/10/01	06/06/02	30/07/02	131	165	None	Charger	Pea
Direct drilling	26/10/01	06/06/02	30/07/02	141	220	None	Charger	Pea
Organic	31/10/01	06/06/02	30/07/02	54	450	None	Charger	Pea

The organic system received no nitrogen fertilisation in 1999–2000 and 2000–2001.

In the 2000–2001 study period, the wheat crop in the organic system was sown in January 2001. We planned to sow this crop in November, but incessant rain between October 2000 and January 2001 rendered this impossible.

#### 2.4. Statistical methods

We used the classic ANOVA (one-way analysis of variance) program of the SAS software suite to compare

the systems. If a significant  $F$  ratio was obtained ( $\alpha < 0.05$ ), we analysed differences between treatments, using Bonferroni's multiple range test. In this study, there were interactions between year and climate and

between year and changes in the cropping system. We therefore chose not to analyse the year effect directly. We focused instead on cropping system effects. ANOVA was carried out with all the individual measurements from each replicate.

### 3. Results

#### 3.1. Disease severity

The severity of *Fusarium* head blight differed considerably from year to year (Table 2). In 2000, severe *Fusarium* head blight was observed, whereas no symptoms were detected in 2001. Disease severity differed significantly between the four cropping systems (Table 2a) in 2000. No difference between the cropping systems was observed in 2001, and in 2002 slight differences were observed between cropping systems but the range of severity observed was limited. In 2000, the direct drilling system displayed the highest level of contamination, followed by the conventional and organic systems. In 2002, the conventional system was the most heavily contaminated. These rankings, in particular that for 2002, which was less clear-cut, were confirmed by analysis of variance: cropping system was found to have a significant effect on disease severity ( $\alpha < 0.001$ ).

The pattern of disease severity observed in the subsystems was similar to that for the systems as a whole (Table 2b): contamination was greatest in 2000, no symptoms were observed in 2001, and 2002 was

intermediate. Analysis of the results for 2000 showed that in two systems (conventional and integrated), the subsystem (conventional cultivar used without fungicide) crop was more heavily infected than the adapted system (appropriate cultivar for the system) crop. In contrast, the subsystem and adapted plots were similar for the direct drilling and organic systems. The direct drilling subsystem displayed the highest level of disease severity. Thus, the factors responsible for this high level of disease were presumably not cultivar or fungicide strategy. In contrast, in the other three systems, disease severity seemed to depend on the cultivar and/or fungicide treatment used. In 2001 and 2002, the adapted cropping systems and the subsystems presented similar levels of disease. A plot effect was detected for the subsystem treatment, with plot I more heavily contaminated than plot II. This effect was significant ( $\alpha \leq 0.001$ ) in 2000.

#### 3.2. The accumulation of mycotoxins in grain

Very little deoxynivalenol (DON) was accumulated in the harvested grain (Table 3a). The DON content was below the maximum levels (750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) cited in provisional European recommendations, for most treatments. The highest levels of accumulation of this toxin were recorded in 2000. In addition to this year effect, a cropping system effect was observed: the direct drilling system (in 2000 and 2002) was systematically and significantly the most heavily contaminated with this toxin. In 2001, when no samples were available for the direct drilling system, the organic system showed significantly higher levels of DON contamination than the other systems.

The results obtained for the subsystems were very similar (Table 3b), with the same year and cropping system effects identified. However, the effects of not applying fungicide differed according to the year. DON contamination of the conventional system plots was lower in the absence than in the presence of fungicide in 2000 and 2001, and higher in 2002. Conversely, the Charger cultivar systematically displayed higher levels of contamination than the cultivar used in the organic system. These factors had different effects on mycotoxin contamination. The integrated and direct drilling systems (for which fungicide protection and cultivar varied simultaneously) displayed higher levels of mycotoxin contamination for the subsystems than for the adapted system, with the exception of the direct drilling system in 2000. However, the choice of cultivar and the decision not to treat had a relatively small effect in this system in this year because DON levels consistently exceeded 4000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (which is much higher than the maximum level recommended). No significant plot effect was identified.

Table 2  
Comparison of disease severity in the four cropping systems during 3 years

Cropping systems	Plots	2000	2001	2002
(a) Adapted cropping system				
Conventional	I	24%	0%	3%
	II	23%	0%	1%
Integrated	I	6%	0%	0%
	II	8%	0%	0%
Direct Drilling	I	34%	—	1%
	II	38%	—	0%
Organic	I	5%	0%	0%
	II	22%	0%	0%
(b) Subsystem: Charger without fungicide				
Conventional	I	63%	0%	4%
	II	22%	0%	1%
Integrated	I	28%	0%	2%
	II	17%	0%	2%
Direct Drilling	I	47%	—	5%
	II	23%	—	3%
Organic	I	2%	0%	5%
	II	1%	0%	3%

Charger is the cultivar used in the adapted conventional system.

The fields were also contaminated with nivalenol and zearalenone. Nivalenol contamination differed significantly ( $\alpha \leq 0.05$ ) between cropping systems in 2001. In all the years studied, nivalenol was detected only in the organic and direct drilling systems. Zearalenone contamination differed considerably from year to year. Zearalenone levels were highest in 2000, with the direct drilling system displaying significantly higher levels of contamination than the other systems ( $\alpha \leq 0.05$ ) in that year. In 2001, only one field (the organic subsystem) had zearalenone contamination. Zearalenone was not detected in 2002. We detected no other mycotoxins.

Table 3  
Comparison of deoxynivalenol accumulation ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) for four cropping systems over 3 years

Cropping systems	Plots	2000	2001	2002
(a) Adapted cropping system				
Conventional	I	1230	120	150
	II	860	nd	380
Integrated	I	430	nd	nd
	II	270	nd	280
Direct drilling	I	7420	nd	400
	II	9100	nd	600
Organic	I	230	430	100
	II	350	370	110
(b) Subsystem: Charger without fungicide				
Conventional	I	490	nd	310
	II	530	60	340
Integrated	I	530	nd	310
	II	320	160	340
Direct drilling	I	4230	—	800
	II	8220	—	1100
Organic	I	370	1120	600
	II	670	1020	600

nd: not detected ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$  is the detection limit).

### 3.3. The relationship between disease severity and deoxynivalenol accumulation

No relationship between disease severity and mycotoxin levels was observed, between or within years (Fig. 1). For example, disease severity was scored at 0% despite DON levels of  $0\text{--}600 \mu\text{g}/\text{kg}$  (years 2001 and 2002). Furthermore, DON levels were low ( $350 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) on plots in which disease severity score was higher (22%).

The lack of a relationship between *Fusarium* head blight severity and mycotoxin content was even more evident for the subsystems. No disease was observed despite DON levels of  $0\text{--}1120 \mu\text{g}/\text{kg}$  (years 2001 and 2002) whereas moderate DON contamination ( $530 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) was recorded for plots with high levels of disease severity (63%). We also found that there was no relationship between disease severity and mycotoxin levels for nivalenol and zearalenone.

## 4. Discussion

Our results demonstrate that *Fusarium* head blight severity depends mainly on climatic effects. Similar results have been obtained in previous studies (Andersen, 1948; Langseth et al., 1995). However, in years with average or high levels of disease, cropping system affects disease severity. The direct drilling system resulted in the highest disease severity in both years for which results were available. In 2000, the direct drilling system wheat crop followed a maize crop whereas the wheat crop of the integrated system followed oilseed rape. In 2002, the preceding crop was pea in both cases. However, the major difference between the direct drilling and integrated systems was the absence of tillage in the direct drilling system: comparison of these two systems, in 2002, can therefore be used to determine the effect of ploughing in residues. Our results seem to support previous conclusions concerning the effects of land

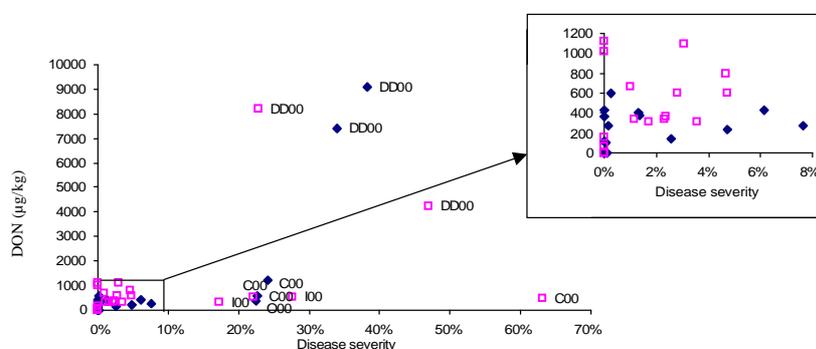


Fig. 1. Relationship between disease severity and deoxynivalenol accumulation in four cropping systems over 3 years. C conventional, I integrated, DD direct drilling, O organic. 00 2000, 01 2001, 02 2002 (♦) adapted cropping system, (□) subsystem: cultivar Charger without fungicide.

preparation (Teich and Nelson, 1984; Teich and Hamilton, 1985; Dill-Macky and Jones, 2000).

An analysis of agronomic traits (head density, yield, grain protein content, *Septoria* leaf spot severity, eyespot severity) revealed no clear reason for the plot effect observed for disease severity in 2000. Follow-up of scab severity between flowering and harvest provided a potential clue: disease severity rapidly increased between June 27 and July 3 in plot I, but not in plot II. This increase in disease severity was probably due to heavy rainfall (21 mm) on July 2nd, after 20 days without precipitation. The experimental field was surrounded by trees and plot II was more protected from rain than plot I, which may have resulted in an edge effect.

This work shows that the *Fusarium* mycotoxin (deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) content of wheat crops depends on both year and cropping system. These results are consistent with those of previous studies (Teich and Hamilton, 1985; Dill-Macky and Jones, 2000): the direct drilling system generally results in the highest levels of contamination, particularly in years with high levels of disease, such as 2000. Moreover, in 2000, the presence of maize immediately preceding the wheat crop in the rotation of the direct drilling system seemed to increase the production of mycotoxins (Teich and Hamilton, 1985; Dill-Macky and Jones, 2000). It was not possible to rank the other systems because no consistent pattern emerged. In 2000 and 2002, the conventional system was more contaminated than the organic system, whereas the reverse was true for 2001. Higher levels of contamination in the conventional system may result from disease severity being high in that year (which was the case in 2000) or may be due to the fungicide used. Indeed in 2000, we used a mixture of strobularins whereas in 2001 and 2002, we used a mixture of strobularins and triazoles. Strobularins belong to a family of fungicide molecules that are particularly effective against *Microdochium* strains but some *Fusarium* strains are limited effectively only by triazole molecules (Maumené et al., 2000). As *Microdochium* produces no toxins, the application of strobularins does not limit mycotoxin levels. Conversely, it might favour the development of pathogenic strains that produce toxins. Thus, the fungicide treatment used in 2000 might have favoured an increase in mycotoxin levels in the adapted conventional system whereas competition between *Fusarium* and *Microdochium* strains may have limited the production of mycotoxins in the organic systems and in the conventional subsystem. In 2000, fungicide application might have resulted in an increase in disease severity in the adapted conventional system, whereas saprophytes might have limited disease development in the adapted organic system. In contrast, in 2002, the absence of fungicide treatment resulted in higher levels of disease

severity. In this case, the molecule used was probably more suitable for the infecting pathogenic strains.

The “contaminating complex” effect, operating under natural contamination conditions is probably responsible of the absence of a relationship between disease severity and DON levels. Our results, which are consistent with those of other authors (Liu et al., 1997), are especially important as they relate to moderate or low disease levels, which may conceal significant contamination by mycotoxins. Indeed, in contrast to studies in which crops were artificially contaminated with a single pathogenic strain of *Fusarium culmorum*, in which such a relationship was found (Teich and Hamilton, 1985; Snijders and Perkowski, 1990), several species of *Fusarium* and *Microdochium* are present in the field in natural contamination conditions. Hence, DON levels, disease severity and the relationship between these variables probably depend on the traits of the species present—capacity to produce disease, capacity to produce mycotoxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone), capacity to produce symptoms and mycotoxins—together with the time at which contamination occurs, the climatic conditions between the time of contamination and harvest, and the nutritive resources that the plant can provide to the pathogenic strains: in other words, the whole cropping system.

## Acknowledgements

This research was funded by the DGAL and by INRA. We would like to thank P. Verger for his suggestion at the start of this study. We would also like to thank Mrs. Tanis-Plant and Mrs. Jerome for editorial advice and Mr. Saulas, Mr. Grandeau, Mrs. Tanneau and Mr. Mille for their contributions to the experimental work.

## References

- Andersen, A.L., 1948. The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat. *Phytopathology* 38, 595–611.
- Atanasoff, D., 1920. *Fusarium* blight (scab) of wheat and other cereals. *J. Agric. Res.* 20 (1), 1–32.
- Ban, T., 2000. Studies on the genetics of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in wheat. In: Suzhou, C., Naujing (Eds.), *International Symposium on Wheat Ingouvernement for ScabResistance*, Section II. Genetic Analysis and Gene Mapping for ScabResistance, pp. 5–10.
- Cassini, R., 1970. Facteurs favorables ou défavorables au développement des fusarioses et septorioses du blé. In: Eucarpia, (Ed.), *Proceeding of Meeting of Sections Cereals and Physiology*, Dijon, pp. 271–279.
- Dill-Macky, R., Jones, R.K., 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Dis.* 84, 71–76.
- Lacey, J., Bateman, G.L., Mirocha, C.J., 1999. Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 134, 277–283.

- Langseth, W., Hoie, R., Gullord, M., 1995. The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination of Norwegian oats 1985–1990. *Acta Agric. Scand.* 45, 63–67.
- Le Boulc'h, V., Bedouret, S., Poyet, V., Barchietto, T., Hazouard, D., De Paepe, I., Seng, J., 2000. Un test innovant pour contrôler la qualité sanitaire des céréales: détection des champignons potentiellement producteurs d'une famille de mycotoxines, les trichothécènes. In: AFPP–6<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes, Vol. 1, Tours, France, pp. 451–458.
- Liu, W., Langseth, W., Skinned, H., Elen, O.N., Sundheim, L., 1997. Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 589–595.
- Maumené, C., Leuillet, M., Caron, D., Henriot, F., 2000. Incidence des fongicides et de la variété sur le risque de contamination du blé tendre par le déoxynivalénol (DON) en France : premiers résultats. In: AFPP–6<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes, Vol. 1, Tours, France, pp. 459–466.
- Maurin, N., Chenet, I., 1993. Espèces de *Fusarium* présentes dans les cultures de céréales en France. *Phytoma* 453, 20–22.
- Mesterhazy, A., 1983. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Z. Pflanzenschutzg-Plant Breeding* 91, 295–311.
- Parry, D.W., Jenkinson, P., McLeod, L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathol.* 44, 207–238.
- Placinta, C.M., D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 21–37.
- Snijders, C.H.A., 1990. *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands J. Plant Pathol.* 96, 187–198.
- Snijders, C.H.A., Perkowski, J., 1990. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* 80, 566–570.
- Teich, A.H., Hamilton, J.R., 1985. Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium, and pH on the incidence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (6), 1429–1431.
- Teich, A.H., Nelson, K., 1984. Survey of *Fusarium* head blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. *Can. Plant Dis. Surv.* 64 (1), 11–13.



### 3- Synthèse et conclusion

#### *Caractérisation des parcelles “bio”, et de leur diversité*

Très peu de références étant disponibles sur la variabilité des couverts en agriculture biologique, nos données permettent dans un premier temps de fournir des valeurs de référence pour les états des couverts biologiques, notamment pour comparaison avec les parcelles conduites selon un mode de culture conventionnel. Ces valeurs sont importantes à considérer dans toute discussion de résultats obtenus en agriculture biologique par rapport à ceux obtenus en agriculture conventionnelle. Par ailleurs, pour ce qui concerne notre recherche propre, les éléments de caractérisation présentés dans les paragraphes qui précèdent témoignent de la grande diversité des états de peuplement sur lesquels a porté notre diagnostic sur le réseau de parcelles biologiques. Nous avons pu ainsi noter que la diversité des couverts sur les parcelles agricoles biologiques de notre réseau était similaire à celle observée sur les parcelles de notre essai systèmes.

En agriculture conventionnelle intensive, la demande croissante des meuniers en blés de qualité (en terme de taux de protéines dans les grains) et l'augmentation du prix de ces blés (qui en découle) incitent les agriculteurs à optimiser les apports d'azote pour éviter les carences : les blés conventionnels présentent généralement un indice de nutrition azotée proche de 1 tout au long de leur culture (comme c'est le cas dans l'essai de longue durée que nous avons mené). En agriculture biologique, les mêmes exigences de qualité existent (David, 2004), mais les moyens de fertilisation disponibles sont différents (et plus restreints) et les études pour valoriser et optimiser ces moyens encore peu nombreuses ; les carences sont dès lors plus fréquentes, et lorsque la biomasse du couvert est forte, ces carences se traduisent, à la récolte, par de faibles taux de protéines. De fait, les deux tiers des parcelles de notre réseau présentent des taux de protéines inférieurs à 12% (le taux nécessaire pour la panification des blés conventionnels), et la moitié d'entre elles des taux inférieurs à 10% (taux nécessaire pour la panification des blés biologiques, David 2004). Ce résultat corrobore celui d'un essai en région centre-est française (David, 2004) où la teneur en protéines maximale atteinte est de 11,7%. Sur nos parcelles, une large gamme d'indices de nutrition azotée a été observée, notamment grâce à la contribution des parcelles de l'essai systèmes, mieux fertilisées que celles du réseau.

Contrairement aux parcelles conventionnelles qui ne sont pas nécessairement labourées tous les ans, les parcelles biologiques le sont : le labour constitue en effet le premier moyen de lutte contre les adventices. En conséquence, les parcelles “bio” suivies ont présenté généralement assez peu de résidus (moins de 20 résidus/m<sup>2</sup>), tandis que les parcelles cultivées de façon conventionnelle sur l'essai systèmes en ont présenté davantage, typiquement de 4 à 60 résidus/m<sup>2</sup> selon le bloc et l'année. La conduite “bio” permet d'éviter de travailler avec une quantité de résidus trop importante, qui serait *a priori* favorable à la maladie.

Les gammes de variation de la densité des couverts sur les parcelles agricoles “bio” de notre réseau sont plus larges que celles obtenues sur les parcelles conduites de façon conventionnelle dans notre essai de longue durée (200 à 710 épis/m<sup>2</sup>, 250 à 1800 g/m<sup>2</sup> de matière aérienne sèche et jusqu'à 60% de recouvrement du sol par des adventices à la floraison dans les parcelles “bio”, contre 600 à 700 épis/m<sup>2</sup>, 1400-1600 g/m<sup>2</sup> de matière aérienne sèche et un recouvrement par les adventices à la floraison inférieur à 10% pour les parcelles “conventionnelles”). Sans surprise, cette comparaison montre que les parcelles conduites en agriculture biologique ont des densités de tiges pouvant être bien inférieures à celles observées dans des parcelles conduites selon un système conventionnel, une situation qui résulte d'un moins bon tallage, probablement dû aux carences azotées évoquées plus haut. Ces données situent aussi les parcelles conduites en agriculture biologique parmi les parcelles présentant le plus d'adventices. Ceci est essentiellement dû (i) aux pousses tardives des adventices, après le dernier passage de la herse, (ii) à l'utilisation d'un mode de désherbage mécanique qui peut

être moins efficace que le désherbage chimique, notamment s'il n'est pas réalisé dans de bonnes conditions, (iii) au temps qui serait nécessaire pour l'arrachage manuel des adventices à pivot comme le chardon ou le rumex, (iv) aux plus faibles densités de semis qui laissent plus de place aux adventices pour prospérer, et (v) à l'utilité de certaines adventices pour l'agriculteur : du trèfle dans un champ de blé n'est pas une adventice à détruire puisqu'il fournit de l'azote à la culture. Enfin, on peut noter que la hauteur des blés sur les parcelles "conventionnelles" de l'essai systèmes (où un raccourcisseur a été utilisé) se situe au milieu de la gamme de variation obtenue sur les parcelles "biologiques" (en raison sans doute d'un compromis entre les effets de la non-utilisation de ces raccourcisseurs et ceux des carences azotées, qui limitent la croissance des plantes, Gate, 1995). Les parcelles conduites en agriculture biologiques sont donc celles qui présentent les couverts les plus diversifiés ; la densité des adventices, elle, est particulièrement forte en système sans travail du sol avec couverture permanente.

Sur le réseau de parcelles "bio", les gammes de variation du nombre de grains par m<sup>2</sup> (de 1500 à 28000 grains/m<sup>2</sup>) et du poids moyen d'un grain (de 25 à 51 mg, à 15% d'humidité) se situent dans les gammes de variation précédemment obtenues en conditions biologiques (de 3500 à 21000 grains/m<sup>2</sup> et de 22 à 57 mg à 15% d'humidité, selon David, 2004). Les rendements dans le Bassin Parisien, en système conventionnel, atteignent fréquemment 90 q/ha ; dans notre essai systèmes, les rendements des parcelles "conventionnelles" ont été de 110 q/ha à 15% d'humidité. Comme attendu, les rendements en parcelles "biologiques" sont bien inférieurs à ceux obtenus en agriculture conventionnelle sur nos parcelles (en moyenne 57 q/ha à 15% d'humidité ; 110 q/ha a été exceptionnellement atteint, sur une parcelle convertie en bio récemment) comme ailleurs en France (de 9 à 74 q/ha à 15% d'humidité, selon David, 2004). Ceci résulte probablement, nous l'avons vu, de la faiblesse de la densité du couvert, d'une fertilisation azotée limitante et de l'infestation par les adventices.

Pour ce qui est des éléments nutritifs autres que l'azote, nous ne disposons pas de références pour les parcelles "biologiques". Cependant, nous pouvons comparer nos résultats pour les parcelles "biologiques" et pour les parcelles "conventionnelles" : sur le réseau comme sur l'essai, les résultats ne sont guère différents pour les parcelles "bio" et pour les parcelles "conventionnelles", même si les premières contiennent en moyenne un peu plus de glucides et un peu moins d'azote, et si les gammes de variation de la composition chimique des couverts sont généralement plus larges dans l'essai systèmes, tous systèmes confondus, que dans le réseau de parcelles biologiques.

Au cours des deux années de suivi, les niveaux d'attaques des parcelles "bio" par les différentes maladies ont été assez semblables à ceux obtenus sur les parcelles "conventionnelle", peut-être même légèrement plus faibles ; ces résultats sont similaires à d'autres (David, 2004). Cette apparente inutilité des produits phytosanitaires utilisés sur les parcelles "conventionnelles" s'explique sans doute en partie par le fait que les attaques de maladies sont avant tout dépendantes du climat, les produits phytosanitaires n'intervenant qu'ensuite. Il est aussi couramment avancé que la compétition plus sévère entre pathogènes permise par l'absence de traitement limite naturellement le développement de chaque espèce. De plus, les agriculteurs bio ne sont pas complètement démunis face aux attaques de pathogènes : ils appliquent souvent des traitements à base de soufre. Enfin, vu les densités de semis plus faibles, les parcelles "bio" sont caractérisées en général par des taux d'humidité plus faibles (pourvu que l'infestation par les adventices ne soit pas trop importante), et une plus faible humidité limite la germination des spores de pathogènes, donc le développement des maladies.

En conclusion, les parcelles "biologiques" que nous avons suivies nous ont donc bien permis l'observation d'une large gamme de situations, différant tant par les pratiques utilisées que par les états du milieu associés. Des gammes de variations intéressantes ont ainsi été obtenues du point de vue des

densités et de la nutrition des peuplements. Les parcelles ont cependant présenté de faibles niveaux d'attaque et de contamination, en comparaison avec la littérature (constat que nous pouvons au moins en partie expliquer par le rôle de la nutrition des couverts sur la maladie, comme nous le verrons un peu plus loin, rôle sur lequel nous reviendrons largement dans la conclusion générale).

### ***Influence de l'environnement***

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, la littérature considère unanimement que de fortes précipitations à la floraison du blé sont propices à la dispersion des spores de champignons, et au développement des symptômes de la fusariose de l'épi et de la contamination en mycotoxines. Différents travaux modélisent donc les niveaux d'attaque ou de contamination en déoxynivalénol à partir de paramètres climatiques mesurés autour de la floraison. Néanmoins, aucun de ces travaux n'a été réalisé à partir de données recueillies dans des gammes de variation similaires aux nôtres. Dans la situation de nos parcelles, il est bien apparu que **le climat pouvait influencer l'attaque des épis ou/et la contamination des grains**, mais, de façon inattendue, certaines des variables qui semblent importantes se situent **pendant le remplissage des grains** plutôt qu'à la floraison : par exemple le cumul des précipitations, qui est inversement relié aux taux de contamination en déoxynivalénol sur le réseau, ou encore la pluviométrie pendant le remplissage des grains, qui a été maximale l'année où les parcelles de l'essai systèmes ont été le plus attaquées et contaminées. Ces contradictions apparentes pourraient être le reflet d'une interaction entre le climat et d'autres paramètres : (i) le complexe de pathogènes présents pourrait être différent selon le climat, (ii) le niveau de résistance des plantes pourrait être différent selon les stress climatiques subis par la plante, ou (iii) des différences de virulence entre champignons pourraient par exemple exister selon le climat. La température, qui n'est que rarement prise en compte, semble aussi un facteur climatique important. Elle pourrait intervenir sur la sélection des pathogènes présents (**Table 1** du chapitre 1) et sur les mycotoxines produites (Sugiura *et al.*, 1990). Une hypothèse supplémentaire, non exclusive, sera développée à la fin de cette thèse.

Par ailleurs, on peut constater que les parcelles qui suivent le moins bien les modèles proposés dans la littérature sont (i) celles, trop peu nombreuses pour être correctement prises en compte, dont les niveaux d'attaque ou de contamination sont les plus forts dans les gammes de variation obtenues, et (ii) celles dont les niveaux d'attaque ou de contamination sont les plus faibles, voire nuls. La présence d'autres champignons pourrait peut-être expliquer les contaminations fortes, pour autant que l'expression de la maladie et/ou de la production de mycotoxines soit stimulée(s) par compétition (ou plutôt synergie) entre microorganismes ; des infections tardives des parcelles par les agents de la fusariose pourraient peut-être contribuer à expliquer les faibles contaminations. Quoi qu'il en soit, ce constat souligne **la nécessité d'affiner les connaissances liées à l'épidémiologie de la maladie, aux voies de dispersion des champignons et aux conditions d'infection des cultures**, pour mieux savoir s'opposer au développement de la maladie et à la production de mycotoxines.

Le type de sol semble également avoir un effet sur ces variables : **un sol plus sableux semble défavorable au développement de symptômes et à la production de toxines**. De nouveau, différentes hypothèses pourraient expliquer ce constat : soit un lien entre l'humidité du sol et la conservation des pathogènes, soit un lien entre la richesse du sol et le développement des pathogènes. Ainsi, la littérature fait état d'une augmentation de la germination des spores avec l'augmentation du taux de glucose dans le sol (notamment dû aux exsudats racinaires de blé), et ce d'autant plus que le sol est pauvre (Cassini, 1973 ; Alabouvette *et al.*, 1985a ; Alabouvette *et al.*, 1985b).

Ces résultats mettent en lumière que **même un climat réputé "favorable" à la fusariose n'a pas toujours pour conséquence l'apparition de symptômes et/ou la production de mycotoxines**, et qu'au contraire **des climats plutôt "défavorables" voient néanmoins l'apparition de symptômes et**

**de mycotoxines associées.** Différentes hypothèses pourraient être testées pour expliquer ce constat : (i) l'absence de champignons potentiellement capables d'être à l'origine de symptômes et/ou de toxines dans les parcelles, (ii) de mauvaises conditions de survie par manque de support ou du fait d'un enfouissement de ces supports, (iii) des conditions environnementales, comme la nutrition disponible pour le champignon, défavorables, (iv) une résistance variétale particulière au développement des champignons, à l'expression de la maladie et/ou à la production de mycotoxines, (v) un système de culture particulier.

#### ***Influence des systèmes de culture***

Les résultats collectés sur l'essai systèmes de longue durée confirment un certain nombre d'observations faites sur le réseau de parcelles et qui ne correspondent pas nécessairement à ce qui est proposé dans la littérature. Ainsi, même si les forts niveaux de contamination en déoxynivalénol sont en général corrélés, dans la littérature, à de forts symptômes de fusariose, il n'en est plus de même, dans nos conditions de contamination naturelle, dans des gammes de faibles niveaux d'attaque et de contamination, tant sur les parcelles du réseau que sur les parcelles de l'essai systèmes : **aucune corrélation forte n'a pu être mise en évidence entre les niveaux d'attaque (intensité et/ou gravité) et les niveaux de mycotoxines (déoxynivalénol et/ou nivalénol).** Dans les mêmes conditions, **les forts niveaux de déoxynivalénol n'ont pas non plus été nécessairement associés aux forts niveaux de nivalénol.**

Les effets de l'absence du travail du sol sur la contamination en déoxynivalénol, eux aussi unanimement décrits dans la littérature, sont bien confirmés par nos résultats sur les parcelles du réseau comme sur l'essai systèmes. Par contre, cette absence de travail du sol ne s'est trouvée corrélée au développement des symptômes de la fusariose (et à la production de nivalénol) que sur les parcelles de l'essai, pas sur le réseau (résultat identique à celui obtenu par Ioos, *com. pers.*). L'absence de travail du sol pourrait avoir un rôle positif pour la fusariose (laisser des résidus culturaux utiles à la conservation des champignons) aussi bien qu'un rôle négatif pour elle (ralentir une décomposition de ces mêmes résidus, *a priori* favorable à la prolifération des champignons).

Il ressort également de l'étude que **plus qu'une pratique culturale (ou un type de climat), c'est la combinaison de pratiques ou de variables climatiques qui est probablement déterminante pour les niveaux d'attaque et de contamination.** Ainsi, la combinaison d'une absence de travail du sol, d'un précédent cultural de type maïs et d'un climat pluvieux pendant le remplissage des grains maximise les niveaux d'attaque et de contamination en déoxynivalénol et nivalénol. On a aussi noté un **effet de l'interaction entre la densité de résidus culturaux, la nutrition des épis et le type de précédent cultural sur la contamination en déoxynivalénol et les intensités d'attaque.** C'est sans doute à cause du rôle principal de ces combinaisons qu'éviter toute culture maïs avant une culture de blé n'apparaît pas, d'après nos résultats, absolument impératif en agriculture biologique : des parcelles de blé cultivées derrière du maïs, mais semées avec des variétés "classiques" pour des agriculteurs biologiques (plutôt résistantes à la fusariose) et labourées, n'ont pas présenté de forts niveaux de contamination et d'attaque. Il semble en effet qu'**un faible taux d'azote dans les épis à la floraison soit un facteur limitant du développement de la maladie et de la production de toxines, surtout s'il s'accompagne d'un faible taux de fructose (pour la maladie) ou d'un fort taux de potassium (pour la contamination en déoxynivalénol).**

De nouveau, ces résultats sont en accord avec certaines observations faites dans la littérature, et s'expliquent probablement, comme nous l'avons dit, par (i) la résistance renforcée des plantes quand elles contiennent des glucides (Messiaen, 1957) et donc peu d'azote (puisque les teneurs de ces deux éléments varient de façon inverse), (ii) le fait que les pathogènes responsables du développement de la fusariose et de la production des mycotoxines associées n'ont pas besoin de beaucoup d'azote, (iii) la

diminution de la résistance à la maladie des plantes lors d'un excès de potassium en cas de carence azotée (Trolldenier, 1969 ; Cassini, 1970), et (iv) l'implication du potassium dans la résistance mécanique des parois cellulaires, qui limite la pénétration des parasites (Trolldenier, 1969), à l'inverse du rôle du déoxyynivalénol (Snijders and Krechting, 1992) qui facilite la propagation des champignons.

Il faut noter que le stade présentant les plus forts taux de glucides et potassium et les plus faibles taux d'azote est la floraison : de toute la phase de remplissage des grains, ce devrait donc être le stade de plus forte résistance, ce qui est contraire à la littérature indiquant que les attaques les plus critiques ont lieu à la floraison (Pugh *et al.*, 1933 ; Strange and Smith, 1971 ; Caron, 1993 ; Lacey *et al.*, 1999). Néanmoins, l'observation que nous faisons d'une plus faible résistance des plantes en fin de remplissage valide l'hypothèse, faite au chapitre 4, d'attaques assez tardives sur les parcelles, notamment en 2001-02. Ce résultat étant nouveau, il demande à être confirmé par d'autres études.

L'importance de la nutrition par rapport au travail du sol ou au précédent cultural réside probablement dans le fait que, même si le champignon est présent (grâce aux résidus de la culture précédente), et même s'il est bien conservé (sur les résidus laissés en surface du sol), le champignon ne peut correctement se développer dans la plante qu'en présence d'un certain nombre de nutriments : même si la toxinogénèse n'est pas forcément liée à des conditions nutritionnelles particulières et qu'elle n'est pas forcément liée à la croissance du champignon (Bakan, 1998), la croissance des champignons, elle, dépend de leur alimentation.

Ce rôle particulièrement important de la nutrition semble aller à l'encontre de l'absence d'effet de la fertilisation des cultures, tant sur nos parcelles agricoles que dans la littérature (Teich and Hamilton, 1985 ; Fauzi and Paulitz, 1994). Cependant, nous avons vu que l'apport de fertilisant ne se traduit pas toujours par une réelle assimilation et donc par une réelle modification de la composition des grains. Ce point pourrait être à l'origine de l'absence d'effet de la pratique "fertilisation". D'autre part, plus que l'alimentation azotée, c'est le rapport du taux d'azote à celui d'autres composés qui semble intervenir, ce qui pourrait aussi être à la base de l'absence de l'effet noté.

La variété semble également intervenir sur les niveaux d'attaque et de contamination. La variété *Charger*, variété classée sensible, semble l'être effectivement si on s'en tient aux symptômes de la fusariose (gravité et intensité). *Charger* et *Isengrain* sont les deux variétés qui ont présenté les plus fortes teneurs en toxines dans leurs grains. D'autres études sont néanmoins nécessaires pour affiner ces résultats. Au vu de l'importance de l'état nutritionnel des cultures pour le développement de la maladie et la production de mycotoxines, il pourrait aussi être envisageable que les variétés diffèrent par leurs états de peuplement. Cependant, aucune différence de densité du peuplement (matière sèche aérienne à la récolte ou nombre d'épi/m<sup>2</sup>), ou de hauteur des épis n'a permis de distinguer les différentes variétés entre elles sur l'essai. Il en est de même en ce qui concerne la composition des épis (taux d'azote, de potassium, de fructose dans les grains à la floraison), à trois exceptions près : le mélange *Somme, Malacca, Renan* et *Camp-Remy* en 1999-00 dans le système biologique, et le mélange *Virtuose, Malacca, Apache* et *Charger* en 2002-03 dans les systèmes intégré et sans travail du sol, étaient plus riches en azote dans les grains que la variété *Charger*. Au contraire, les épis de la variété *Charger* contenaient plus de potassium et de magnésium à floraison que ceux de la variété *Apache* en système biologique en 2002-03, ou ceux du mélange *Virtuose, Malacca, Apache* et *Charger* en 2002-03 dans les systèmes intégré et sans travail du sol. La plus forte teneur en azote (respectivement potassium) dans les épis de *Charger* par rapport aux autres variétés pourrait expliquer sa plus forte sensibilité à la maladie (respectivement son plus fort contenu en déoxyynivalénol). Ces derniers résultats sembleraient en tout cas confirmer les observations faites sur le réseau de parcelles. Il sera nécessaire de déterminer si ces quelques différences de composition chimique des épis résultent des conditions de culture ou d'une caractéristique génotypique des variétés.

Un traitement fongicide seul ne semble pas être *a priori* une bonne solution pour lutter contre la fusariose et/ou la production de toxines : son efficacité sur nos parcelles n'est pas évidente. D'autres études sont nécessaires pour comprendre les causes de ce manque d'efficacité ; et ce d'autant plus que la relative inefficacité observée en 2002-03 ne peut pas s'expliquer par une différence des états du couvert à la floraison (en terme de densité du peuplement, de hauteur d'épis et/ou de nutrition (taux d'azote, de potassium, de phosphore, de saccharose, de glucose, de fructose dans les grains) entre les blés ayant reçu un traitement fongicide et les autres.

Au cours de ce travail, nous avons observé d'importants effets du type de système de culture utilisé. **Le système "sans travail du sol avec couverture permanente" est largement plus contaminé par les mycotoxines que les autres, souvent suivi** (à l'exception des parcelles "contrôle" en 2000-01 et des parcelles de 2002-03) **par le système "conventionnel", puis par le système "intégré", et enfin par le système "biologique" qui est plutôt moins contaminé et attaqué.** A l'exception de ce dernier système, les symptômes d'attaque par la fusariose sont assez similaires pour les différents systèmes. Une nouvelle fois, on notera qu'indépendamment de la variété, les parcelles du système biologique ont une nutrition azotée plus faible et des taux en glucides supérieurs aux autres systèmes, ce qui pourrait expliquer des niveaux d'attaque moindres.

**Le réseau de parcelles en système biologique a situé notre étude dans des conditions de faibles niveaux d'attaque et de contamination.** Le choix, fait au démarrage du projet, de se placer en système biologique s'avère ne pas avoir permis de révéler autant d'effets des pratiques culturales que nous l'aurions souhaité. Ceci dit, la variabilité d'efficacité des traitements fongicides ne nous permettait pas de situer l'étude en milieu conventionnel. Souhaitant en effet travailler sur des systèmes de culture cohérents pour les agriculteurs, nous pouvions donc difficilement placer notre étude dans un autre système que le système biologique. Enfin, dans ce type d'agriculture, nous avons pu mettre en lumière que l'étude du rôle des adventices nécessite des études dans lesquelles la seule variable "adventice" (en terme de densité et de nature des adventices) devrait varier, afin de correctement déterminer l'effet de cette variable dans le couvert. En système conventionnel, l'absence d'adventices dans le couvert interdit d'apprendre quoi que ce soit sur le rôle de ces adventices.

### ***Bilan provisoire***

Si notre diagnostic agronomique a permis de révéler un certain nombre de pistes de réflexion, il n'a pas permis de comprendre l'origine des niveaux extrêmes (nuls ou très forts). Plusieurs points peuvent être évoqués pour comprendre ces résultats contrastés.

En premier lieu, les gammes de conditions climatiques, d'attaques et de contaminations en mycotoxines ont été faibles, on l'a dit, et cela n'a pas joué en notre faveur.

Le second point vient du principe même de la méthode, qui est de chercher des corrélations entre les systèmes de culture et les variables étudiées. De grandes lacunes demeurent concernant la connaissance de l'épidémiologie de la fusariose de l'épi. Il est de ce fait délicat d'interpréter et donc de hiérarchiser les effets du climat, des pratiques culturales et de leurs interactions possibles, sur les différentes étapes du développement du champignon. Bien que la méthode ait été de nombreuses fois employée (Boiffin *et al.*, 1981 ; Diouf, 1990 ; Doré, 1992 ; Savary *et al.*, 1994 ; Dalbiès-Dulout, 1999), elle a généralement été appliquée pour évaluer les causes de variations du rendement d'une culture. Dans ces cas-là, les très nombreuses études réalisées sur le sujet avaient permis de déterminer au préalable les variables d'importance à considérer lors de l'étude, et la méthode du diagnostic agronomique est tout à fait appropriée dans un tel contexte. Dans notre cas, peu d'études ont déjà été

réalisées, et ni les causes effectives du développement de la maladie et de la production de toxines, ni les variables susceptibles d'influer dessus, ne sont identifiées. Tenter un diagnostic nous demandait de chercher en même temps (i) les éléments pouvant expliquer attaques et contaminations, “dans l'absolu”, et (ii) les pratiques culturales favorisant ou défavorisant la maladie. Il est donc bien possible que nous n'ayions pas considéré tout à fait les bonnes variables.

Le troisième point est lié au précédent : il s'agit de la difficulté de remonter des variables identifiées (comme la nutrition des blés) aux pratiques agricoles susceptibles d'influer sur ces variables, et de déboucher alors sur des propositions de modifications des systèmes de culture. La nutrition effective d'un couvert, par exemple, dépend de la fertilisation (difficilement maîtrisée en agriculture biologique), de la densité du couvert, en blé et en adventices... Dans notre cas, l'absence d'effet franc des caractéristiques du milieu et/ou du peuplement sur les attaques de fusariose et/ou les contaminations en mycotoxines ne nous a pas permis d'en comprendre l'origine *via* les effets des différentes pratiques culturales.

Le dernier point concerne le dispositif expérimental que nous avons utilisé. Un réseau de parcelles doit permettre d'obtenir une base de données couvrant l'ensemble des paramètres environnementaux et l'ensemble des pratiques culturales employées par les agriculteurs. De ce fait, les parcelles sélectionnées sont très différentes et même si nous avons essayé de limiter les “profils de parcelles” en sélectionnant par exemple uniquement des parcelles semées avec quelques variétés, la forte diversité des situations et le petit nombre de chacune (par exemple deux parcelles agricoles non labourées seulement, une seule parcelle semée avec *Isengrain*) limitent fortement la compréhension de ce qui se passe réellement sur une parcelle quand elle semble répondre différemment des autres (cas de la parcelle EI par exemple). En effet, dans ce genre de situation, le réseau de parcelles soulève autant, voire plus, de questions qu'il ne permet d'en résoudre : ne disposant d'aucun autre résultat que les nôtres, nous ne pouvons pas guère tester nos interprétations : observons-nous un artefact, une confusion d'effets ou vraiment un effet significatif ? Des expérimentations analytiques sont alors nécessaires pour tester un certain nombre d'hypothèses émises à partir des résultats “atypiques” du réseau de parcelles.

**Tableau 6-1-1 : Mycotoxines produites par les diverses espèces de *Fusarium* des céréales**

<b>Espèce de <i>Fusarium</i></b>	<b>Mycotoxines produites</b>
<i>F. graminearum</i>	<b>DON, ZEN, NIV, FUS, AcDON, DAcDON, DAcNIV</b>
<i>F. culmorum</i>	<b>DON, ZEN, NIV, FUS, ZOH, AcDON</b>
<i>F. avenaceum</i>	<b>MON</b>
<i>F. poae</i>	<b>DAS, MAS, NIV, FUS, T2, HT2, NEO</b>
<i>F. crookwellense</i>	<b>NIV, FUS, ZEN, ZOH</b>
<i>F. equiseti</i>	<b>DAS, ZEN, ZOH, NIV, DAcNIV, MAS, FUS</b>
<i>F. sporotrichioides</i>	<b>T2, HT2, NEO, MAS, DAS</b>
<i>F. tricinctum</i>	<i>MON</i>
<i>F. subglutinans</i>	<b>BEA, MON, FUP</b>
<i>F. acuminatum</i>	<b>T2, HT2, DAS, MAS, MON, NEO</b>
<i>F. chlamydosporum</i>	<b>MON</b>
<i>F. heterosporum</i>	<b>ZEN, ZOH</b>
<i>F. moniliformine</i>	<b>FB<sub>1</sub></b>
<i>F. oxysporum</i>	<i>MON</i>
<i>F. proliferatum</i>	<b>FB<sub>1</sub>, BEA, MON, FUP</b>
<i>F. sambucinum</i>	<b>DAS, T2, NEO, ZEN, MAS</b>
<i>F. semitectum</i>	<b>ZEN</b>
<i>F. venenotum</i>	<i>DAS</i>

En gras les toxines les plus courantes ; en italiques les moins courantes. AcDON mono-acétyldéoxynivalénols, BEA Beauvericine, DAS Diacétoxyscirpénol, DON Déoxynivalénol, FB<sub>1</sub> Fumonisine B<sub>1</sub>, FUP Fusaproliferin, FUS Fusarénone-X, HT2 HT2 Toxine, MAS Monoacétoxyscirpénol, MON Moniliformine, NEO Néosolaniol, NIV Nivalénol, T2 T2 Toxine, ZEN Zearalénone, ZOH Zéaralénols

selon Bottalico, 1998

## Chapitre 6 - Apports d'une caractérisation génétique des populations de *Fusarium* pour le diagnostic des effets des systèmes de culture sur la contamination en mycotoxines

Dans le cas -qui a été le nôtre- de faibles niveaux d'attaque et de contamination, nous venons de voir au chapitre précédent qu'il n'est pas évident d'identifier les effets des systèmes de cultures sur ces attaques et ces contaminations en se limitant à une approche "traditionnelle" de la fusariose. Ceci s'explique tout d'abord par la faiblesse des connaissances épidémiologiques sur cette maladie, qui nous empêche d'identifier de manière précise, puis de hiérarchiser, les effets des différentes pratiques culturales et de leurs interactions. Mais il est aussi tout à fait probable que le type exact de pathogène infectant (la "composante génétique" de la maladie) ait une importance majeure dans la détermination des niveaux de maladie et de production de toxines. En effet, la fusariose résulte, nous l'avons déjà largement évoqué, de l'infection des grains par un complexe de champignons des genres *Fusarium* et *Microdochium*. Or, un seul de ces genres comporte des espèces toxigènes : le genre *Fusarium*. De plus, les différentes espèces de *Fusarium* ne produisent pas toutes les mêmes toxines (**Tableau 6-1-1**), et nombre d'auteurs considèrent que les trichothécènes (notamment le déoxynivalénol) produites par des espèces de *Fusarium* jouent un rôle important dans l'agressivité de certains de ces champignons (Casale and Hart, 1986 ; Chen *et al.*, 1996 ; Desjardins *et al.*, 1996 ; Hestbjerg *et al.*, 2002 ; Mesterhazy, 2002 ; Proctor *et al.*, 2002). Ainsi, il a été montré que certains mutants déficients pour la production de déoxynivalénol sont moins agressifs sur le blé que la souche originale (Eudes *et al.*, 2001). De même, les mutants de *F. graminearum* les moins virulents pour coloniser la plante sont des souches mutées sur le gène *tri5*, gène de production des trichothécènes, et donc incapables de produire du déoxynivalénol ou du nivalénol (Desjardins *et al.*, 1996). De fait, les trichothécènes sont considérées comme facteurs de virulence, lors de l'infection du blé par *F. graminearum* (Eudes *et al.*, 2000 ; Eudes *et al.*, 2001) ou lors de l'infection de l'orge par *F. culmorum* (Hestbjerg *et al.*, 2002). Par conséquent, le potentiel toxigène des diverses espèces, et des diverses souches à l'intérieur d'une même espèce, pourrait bien influencer la propagation des champignons dans l'épi et/ou l'expression de la fusariose.

Différentes espèces, comme *F. crookwellense* (Miller *et al.*, 1991), *F. sambucinum* (Miller *et al.*, 1991), *F. sporotrichioides* (Miller *et al.*, 1991) ou *F. pseudograminearum* (Blaney and Dodman, 2002) présentent des souches de potentiels toxigènes différents. Au sein d'une même espèce, comme *F. graminearum* (Mirocha *et al.*, 1989 ; Jin and Yoshizawa, 1994 ; Miedaner *et al.*, 1999 ; Blaney and Dodman, 2002 ; Cromey *et al.*, 2002 ; Chandelier *et al.*, 2003) ou *F. culmorum* (Gang *et al.*, 1998 ; Hestbjerg *et al.*, 2000 ; Muthomi *et al.*, 2000 ; Miedaner and Reinbrecht, 2001 ; Hestbjerg *et al.*, 2002 ; Chandelier *et al.*, 2003), toutes les souches ne produisent pas non plus les mêmes toxines : on parle de "chénotype déoxynivalénol" et de "chénotype nivalénol" selon la toxine produite par les souches (**Tableau 2-1**) ; les deux voies de biosynthèse sont en effet réputées incompatibles (Mirocha *et al.*, 1989). L'agressivité vis-à-vis des épis des souches de "chénotype déoxynivalénol" de *F. graminearum* (Miedaner *et al.*, 1999) ou de *F. culmorum* (Gang *et al.*, 1998 ; Nicholson *et al.*, 2003) est généralement supérieure à celle des souches de "chénotype nivalénol". Ceci pourrait être dû à une plus faible phytotoxicité du nivalénol par rapport au déoxynivalénol (Eudes *et al.*, 1997 ; Miedaner *et al.*, 1999). Les deux types de souches cohabitent souvent dans un même champ, "au hasard", sans aucune régionalisation de leur potentiel (Jennings *et al.*, 2003).

Les voies de synthèse des deux toxines ne sont en réalité pas complètement incompatibles, et certaines souches produisent les deux types de mycotoxines en même temps (Lori *et al.*, 1992). Certains auteurs (Bakan *et al.*, 2001) parlent même plutôt de chénotype "déoxynivalénol fort" et de chénotype "déoxynivalénol faible", signifiant ainsi que toutes les souches qu'ils ont étudiées produisent du déoxynivalénol ; celles dites "déoxynivalénol faible" étant par ailleurs phylogénétiquement proches de



souches réputées de “chénotype nivalénol”, toutes les souches employées par ces auteurs sont productrices de nivalénol (Barreau, *com. pers.*). De nouveau, on n’observe dans les champs aucune localisation préférentielle de l’une ou l’autre de ces souches (Bakan *et al.*, 2001). Au sein du “chénotype déoxynivalénol”, deux autres sous-chénotypes ont été aussi proposés, selon le dérivé mono-acétyldéoxynivalénol produit préférentiellement en association avec déoxynivalénol (Miller *et al.*, 1991) ; cependant, cette distinction entre ces deux sous-chénotypes a été remise en cause par Sugiura *et al.* (1990), qui indiquent que la production préférentielle de l’une ou de l’autre toxine est fonction de la température de croissance. Par ailleurs, quelques souches de *F. graminearum* et de *F. culmorum* semblent ne produire aucune toxine (Bakan *et al.*, 2001).

Nous avons vu au chapitre 1 que si, pour certains auteurs, une relation existe bien entre les niveaux de symptômes de l’épi et les niveaux de contamination des grains par les toxines, les différentes études menées ne valident pas toutes l’existence de cette relation -que nous-mêmes n’avons pas obtenue- (**Chapitre 5**). Les résultats obtenus par inoculation avec une souche unique semblent montrer que l’environnement peut influencer sur la relation symptômes/toxines (Bai *et al.*, 2001). Mais en conditions naturelles ou après inoculation avec un mélange d’espèces, le polymorphisme d’espèces ou de souches pourrait bien constituer une explication alternative, ou supplémentaire, à l’absence de relation symptômes/toxines : tous les champignons à l’origine des symptômes de fusariose ne sont pas responsables de la production de toxines, mais seulement certaines espèces, ou encore seulement certaines souches.

Pour essayer de comprendre, en conditions agricoles et sous contamination naturelle, ce qui régit la relation entre les niveaux d’attaques de fusariose et la contamination des grains par les mycotoxines associées, nous avons tenté d’identifier précisément les champignons responsables de la fusariose sur nos parcelles, et de déterminer leurs rôles dans la production de toxines. Après une première partie expliquant comment nous avons identifié ces champignons ainsi que leurs potentiels toxinogènes, la seconde partie de ce chapitre présentera la diversité des profils d’espèces que nous avons pu observer sur nos parcelles, et les effets des systèmes de cultures des différentes parcelles sur ces profils d’espèces. La troisième et la quatrième partie porteront sur la recherche de relations entre ces profils d’espèces et les niveaux de symptômes, et entre ces profils d’espèces et les niveaux de contamination par les mycotoxines. A chaque fois, nous analyserons l’effet des pratiques agricoles sur ces relations. Pour finir, nous tenterons de pousser l’analyse plus loin, en tenant compte non plus seulement du profil d’espèces de *Fusarium* observé, mais aussi des divers chénotypes des souches de *F. graminearum* et de *F. culmorum* présentes sur les parcelles.

## 1- Matériels et méthodes

L’évaluation des symptômes apparaissant sur les épis et de la contamination des grains en toxines a été réalisée comme déjà décrit dans le chapitre 3 et utilisé aux chapitres 4 et 5. Seules les méthodes spécifiques au présent chapitre sont décrites ici.

### 1.1- Dispositifs

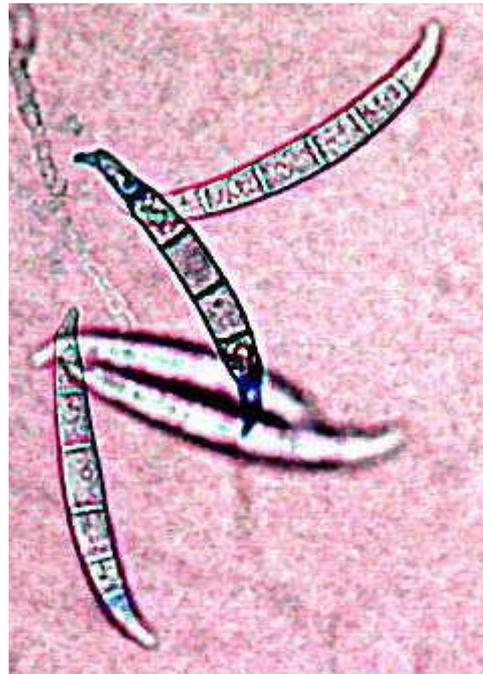
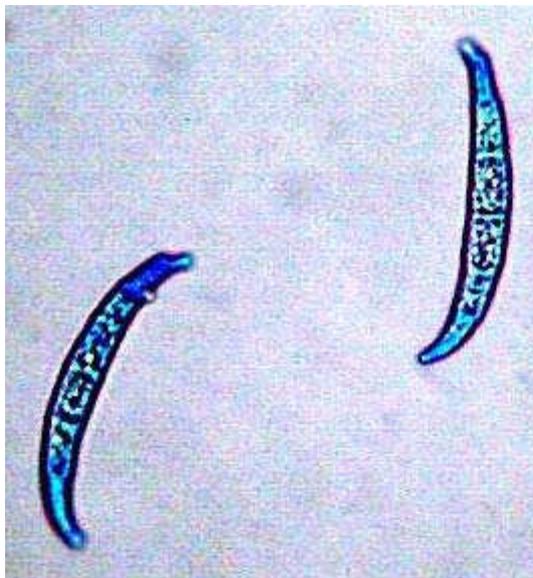
En plus du réseau de parcelles agricoles et de “l’essai systèmes” décrits dans le chapitre 3, nous avons utilisé pour le travail décrit dans ce chapitre deux autres dispositifs expérimentaux très réduits. Le premier a été installé en 2001-02 sur la parcelle de l’essai systèmes conduite en système intégré. Sur 0,2 m<sup>2</sup> environ, 9 épis de la variété *Apache* et 10 de la variété *Charger* y ont fait l’objet d’un suivi sanitaire tout au long de la culture. A la récolte, tous les grains de ces épis ont été mis en culture, et le profil d’infection de ces épis par les champignons du complexe fusarien a été déterminé comme décrit ci-dessous. Le second dispositif a consisté à diviser une parcelle en sous-parcelles, et à traiter celles-ci

**Figure 6-1-1 : Photographies de spores de *Fusarium***

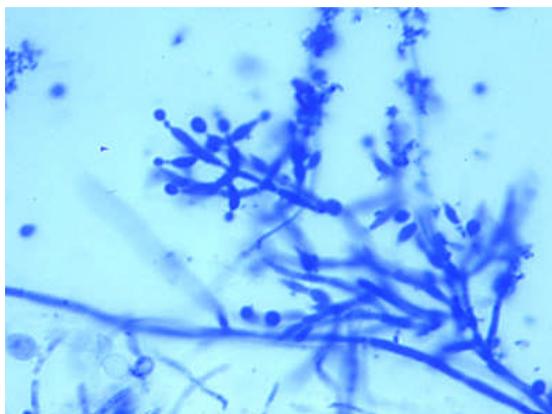
a- Macroconidies de *F. culmorum*



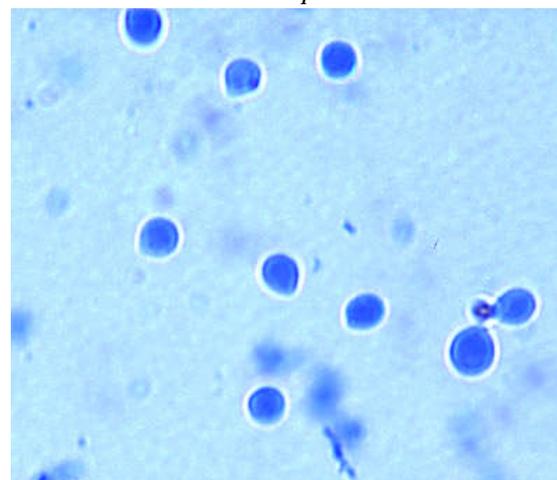
b- Macroconidies de *F. graminearum* (2 photographies)



c- Conidiophores à monophialides de *F. poae*



d- Microconidies de *F. poae*



Colorant rose : Fuchsine (0.3g/250 ml d'acide lactique), Colorant bleu : Bleu de methyl (0.4g/150 ml d'acide lactique). Photos prises au grossissement x 400 puis l'image a été agrandie.  
Photographies du LNPV-UMAF (Nancy)

comme si elles étaient des parcelles indépendantes. Nous avons ainsi réalisé 6 prélèvements de 300 g de grains sur la parcelle EI en 2001-02, et 9 prélèvements d'1 kg de grains sur la parcelle BV en 2002-03, selon les modalités de prélèvements décrites au chapitre 3. Un suivi sanitaire (en terme d'évaluation du taux d'infection par chaque espèce de champignons et du niveau d'attaque par la fusariose) et des dosages toxicologiques ont également été réalisés sur chaque prélèvement ; ceci afin d'une part d'appréhender la variabilité intra-parcellaire du profil d'espèces infectantes, et d'autre part de tenter de relier cette variabilité de l'infection aux différentes contaminations en toxines et d'attaque de fusariose. Cette relation ne pourra être étudiée que sur les dosages de déoxynivalénol, les teneurs en nivalénol n'ayant été quantifiables qu'une seule fois et la variabilité des niveaux d'attaque étant donc insuffisante pour une quelconque analyse.

## 1.2- Identification des différentes espèces par analyse morphologique

A partir des échantillons récoltés (et avant leur séchage), quelques centaines de grains (par parcelle agricole ou par traitement expérimental dans l'essai systèmes) ont été isolés des autres, "au hasard", et conservés entre 0 et 5°C. Puis, environ 50 ml de grains sont stérilisés en surface (*a priori*, les champignons responsables des symptômes et de la production de toxines ont déjà pénétré les grains) par trempage pendant 10 minutes dans une solution contenant 0,37% d'hypochlorite de sodium (NaHClO) et 0,01% de Tween 20 (tensioactif servant à donner au grain une certaine "mouillabilité") puis sont complètement séchés sur un papier filtre stérile, dans une hotte à flux laminaire. L'isolement, puis l'identification au niveau du genre des champignons présents sur les grains, ont été réalisés en 2001-02 au Laboratoire de Phytopathologie et Méthodologies de la Détection à l'INRA de Versailles, et en 2002-03 au Laboratoire National de la Protection des Végétaux de Nancy.

En 2001-02, à Versailles, 300 grains de chaque échantillon ont été prélevés au hasard et placés dans un milieu de culture Potato-Dextrose-Agar (PDA ; la composition en est présentée en **Annexe 4**), en boîtes de Pétri (10 grains par boîte de Pétri). Les boîtes de Pétri sont incubées durant 6-10 jours à température ambiante, sans éclairage particulier : s'il y a un ou plusieurs (très rarement) champignon(s) dans un grain donné et sur la boîte de Pétri, ces champignons se mettent à pousser et on récupère les petites colonies qui se forment en les repiquant en tubes de verre avec du PDA pour conservation. Toutes les colonies de *Microdochium* et de *Fusarium* ont été isolées et comptées, mais seules les colonies de *Microdochium* ont été identifiées morphologiquement par le laboratoire de Versailles, tandis que les colonies de *Fusarium* (en fait, la moitié seulement d'entre elles) y ont été simplement repiquées.

En 2002-03, à Nancy, 100 grains (comme dans les travaux de Cromeley *et al.*, 2002) ont été prélevés au hasard et placés dans le même milieu PDA que l'année précédente, toujours en boîtes de Pétri, alors que 100 autres grains étaient placés dans un milieu de culture Dichloran-Chloramphenicol-Peptone-Agar (DCPA, **Annexe 4**), également en boîtes de Pétri. Le milieu DCPA est utilisé pour la détection spécifique des *Fusarium* : les boîtes correspondantes sont incubées pendant 10-12 jours dans une enceinte climatique, thermostatée à 22°C (+/- 3°C) et avec des phases d'éclairage et d'obscurité alternant toutes les 12 heures. Les boîtes contenant le milieu PDA sont, elles, examinées une première fois après 6 jours d'incubation à l'obscurité dans une chambre froide à 6°C (+/- 2°C), conditions qui favorisent le développement des *Microdochium* par rapport aux *Fusarium*. Ces boîtes PDA sont ensuite incubées 6 jours dans les mêmes conditions que les boîtes DCPA (22°C et alternance lumière/obscurité) pour développer la sporulation de *Microdochium*.

Chaque isolat récupéré (ceux de 2002-03 et aussi ceux de 2001-02, à l'exception des *Microdochium* déjà identifiés par le laboratoire de Versailles) a été ensuite identifié au niveau de l'espèce par le Laboratoire National de Protection des Végétaux. Les isolats de *Microdochium nivale* sont directement identifiés sur le milieu de culture PDA. Les macroconidies de *F. culmorum*, *F. graminearum* et les microconidies de *F. poae* sont directement identifiées sur le milieu DCPA (**Figure**



**6-1-1).** Les autres isolats de *Fusarium spp.* sont transférés du milieu DCPA vers un milieu PDA et un milieu SNA (synthetiser-nährstoffärmer-agar, **Annexe 4**) favorisant la sporulation des *Fusarium*, et après 6 à 10 jours d'incubation à 22°C, ils sont finalement identifiés selon le classement de Nelson *et al.* (1983) et Nirenberg (1981). Les isolats de *Fusarium* sur gélose ("implants") sont ensuite conservés dans de l'huile de paraffine minérale stérile. Le Laboratoire de Nancy estime à 1% la précision de son identification, c'est-à-dire que si une analyse mycologique faite sur 100 grains permet de détecter  $n_i$  fois l'espèce  $e_i$ ,  $n_i$  défini à plus ou moins 1. *Au total, sur ces critères morphologiques, environ 350 isolats de Microdochium ont été identifiés par le laboratoire de Versailles ; 85 isolats de Microdochium et près de 1600 isolats de Fusarium ont été identifiés par le laboratoire de Nancy.*

### **1.3- Vérification de l'identification morphologique par une identification moléculaire**

Après l'identification morphologique des champignons présents dans 57 isolats, l'identité de ces isolats a été vérifiée par une analyse génétique réalisée par l'entreprise Biotransfer (Montreuil-sous-Bois, France). Pour cela, l'ADN des champignons a d'abord été extrait selon le protocole modifié de Edwards *et al.* (2001), comme décrit dans l'**Annexe 5**, puis deux techniques d'identification moléculaire ont été utilisées (**Annexe 5**), toutes deux basées sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de certaines régions de l'ADN (acide désoxyribonucléique) du champignon. La première utilise deux zones intergéniques de l'ADN ribosomal des champignons (ITS1 et ITS2, Internal Transcribed Spacer). La seconde utilise le gène EF1alpha (Elongation Factor 1-alpha) ; elle n'est mise en œuvre qu'en cas de désaccord entre l'identification morphologique et le test génétique précédent.

L'identification moléculaire a confirmé 55 identifications morphologiques sur 57 : 8 *F. culmorum*, 1 *F. lateritium*, 16 *F. poae*, 7 *F. tricinctum*, 7 *F. avenaceum*, 2 *F. equiseti* et 9 *F. graminearum* de la récolte 2002-03, ainsi que 5 *F. monoliforme* de la récolte 2001-02, ont ainsi été identifiés sans ambiguïté. A l'inverse, un *F. tricinctum* (selon l'analyse génétique) avait été pris (à la suite de l'analyse morphologique) pour un *F. avenaceum*, un *F. culmorum* pour un *F. graminearum*. Ces quelques erreurs, ainsi que le faible nombre d'isolats correspondant à certaines espèces, nous ont conduits, dans nos analyses statistiques, à ne pas considérer individuellement chaque espèce de *Fusarium*, mais à les agréger en trois groupes d'espèces : les espèces potentiellement productrices de déoxynivalénol et de nivalénol (*F. culmorum* et *F. graminearum*), les espèces potentiellement productrices, au moins, de nivalénol (les deux précédentes, ainsi que *F. poae*, *F. equiseti* et *F. crookwellense*), et les espèces non toxigènes (les autres, notamment *F. avenaceum* et *F. tricinctum*, qui sont les plus fréquentes).

### **1.4- Caractérisation génétique du potentiel toxigène**

La détection du potentiel génétique de production de toxines de divers isolats de champignons est basée sur l'amplification de l'un des gènes de la voie de biosynthèse des trichothécènes. Plusieurs gènes sont utilisables pour cela : par exemple le gène *tri5* (Niessen and Vogel, 1998 ; Le Boulc'h *et al.*, 2000a ; Le Boulc'h *et al.*, 2000b), ou les gènes *tri3* et *tri7* (Figure 2-5). Le gène *tri5* code pour une enzyme, la trichodiène synthase, catalysant la première étape de la voie de biosynthèse des trichothécènes. Cette enzyme agissant très en amont dans la chaîne de biosynthèse, le gène qui code pour elle est présent chez tous les champignons producteurs de trichothécènes ; inversement, si le gène ne peut pas être détecté, c'est que l'enzyme est absente, et la souche considérée est incapable de produire des trichothécènes. C'est de nouveau le laboratoire d'analyse Biotransfer qui a réalisé cette analyse d'amplification par PCR du gène *tri5* (**Annexe 5**).

La détection du gène *tri5* a été réalisée sur 168 souches, parmi toutes celles isolées à partir de nos dispositifs : sur les 168 souches analysées, 4 correspondaient à des isolats de *F. tricinctum* (3) ou de *F. lateritium* (1), qui sont des espèces *a priori* non productrices de trichothécènes, et elles étaient donc

**Tableau 6-1-2 : Potentiel toxigène de souches de *Fusarium* sur grains de blé : mesure de la production de toxines *in grano* et test génétique**

Souches <sup>a</sup>	Présent dans la publication de Bakan, 2002	Production de toxines mesurée <i>in grano</i>				Résultat du test moléculaire <i>tri5-tri6</i> caractérisant le potentiel toxigène de déoxynivalénol <sup>b</sup>	
		Déoxynivalénol, mg/kg	Nivalénol, mg/kg	3-acétyl déoxynivalénol mg/kg	15-acétyl déoxynivalénol, mg/kg		
<i>F. culmorum</i>	M1	oui	0,01	0,11	non détecté	non détecté	faible
	P2	oui	0,05	0,05	non détecté	non détecté	faible
	A4	oui	0,67	0,31	non détecté	non détecté	faible
	C8	oui	7.52	0,01	0,96	non détecté	fort
	E1	oui	5.77	0,05	0,64	non détecté	fort
	B3	oui	5.54	0,5	1.68	non détecté	fort
	R964	oui	15.65	inconnu	inconnu	non détecté	fort
	A1	non	0,08	4.60	inconnu	inconnu	faible
	A5	non	non détecté	3.82	inconnu	inconnu	faible
	B1	non	non détecté	2.30	inconnu	inconnu	faible
<i>F. graminearum</i>	INRA A/ CBS185 32	non	276.00	0.6	non détecté	146	fort
	INRA 95/ M01.41	non	689.00	non détecté	inconnu	inconnu	fort
	INRA 39/ CBS316 73	non	non détecté	non détecté	inconnu	inconnu	fort
	INRA 91/ M01.32	non	23.4	66.2	18.2	6.8	indéterminé

<sup>a</sup>Souches sur lesquelles la méthode *tri5-tri 6* est évaluée, fournies avec le dosage par HPLC de leur production potentielle en mycotoxines *in grano* par l'UR Mycologie et sécurité des aliments de l'INRA de Bordeaux. <sup>b</sup>Détection du potentiel toxigène par BioTransfer.

attendues “*tri5* négatif” : de fait, elles ont bien été reconnues comme telles par le test PCR. Sur les 164 autres souches identifiées comme appartenant à des espèces potentiellement productrices de trichothécènes (8 *F. culmorum*, 30 *F. graminearum*, 123 *F. poae* et 3 *F. equiseti*), seules 9 souches, soit à peine 5% des souches (6 *F. poae* sur les 123, et les 3 *F. equiseti*) ont été détectées comme ne possédant pas de gène *tri5* : cette proportion étant très faible, les différences de contamination des différentes parcelles de nos dispositifs ne sont probablement pas reliées à la présence ou à l’absence de ce seul gène *tri5*. Nous n’avons donc pas continué l’analyse *tri5* sur les autres souches. Nous avons plutôt entrepris de caractériser une région intergénique des gènes *tri5* et *tri6* (**Annexe 5**), réputée déterminante pour le niveau de production de déoxynivalénol par Bakan *et al.* (2002) : si le gène *tri5*, nous l’avons dit, code pour la trichodiène synthase catalysant la première étape de la biosynthèse des trichothécènes ; le gène *tri6*, code, lui, pour une protéine régulatrice de la biosynthèse des trichothécènes, et ce sont 8 nucléotides délétés dans la région intergénique qui caractérisent les souches de *F. culmorum* de “faible potentiel de production” de déoxynivalénol, par comparaison aux souches dites de “fort potentiel de production” de cette toxine. Ces auteurs n’ont cependant caractérisé que des souches de l’espèce *F. culmorum*. Afin d’élargir ce test aux différentes souches de l’espèce *F. graminearum*, il a été appliqué à quatre souches de *F. graminearum* dont le potentiel toxigène avait été antérieurement mesuré “*in grano*” par l’UR Mycologie et Sécurité des Aliments de l’INRA de Bordeaux, en même temps qu’il l’était à dix souches de *F. culmorum* de potentiel également mesuré à Bordeaux. Le résultat *tri5-tri6* sur ces souches est montré dans le **Tableau 6-1-2**, en même temps que les quantités de toxines qu’elles ont été capables de produire sur des grains inoculés au laboratoire de Bordeaux. Cette mesure a été réalisée sur grains (“*in grano*”), car il arrive très fréquemment qu’une souche à fort potentiel ne produise pas de toxines quand on la cultive en milieu liquide. Des grains ont d’abord été humidifiés pendant 4 à 7 jours à 4°C (l’eau recouvrant tout juste la surface des grains), puis très soigneusement égouttés, répartis dans des erlens (110 g/erlen de 500 mL) et autoclavés 25 minutes à 110°C (pour se débarrasser des champignons endogènes, qui interfèreraient avec les champignons à inoculer). Une fois les grains bien imbibés d’eau et stérilisés, ils ont été inoculés avec les souches mentionnées dans le **Tableau 6-1-2**, préalablement incubées pendant 15 jours à 26 °C dans 100 ml de milieu GYEP (**Annexe 4**). Après 21 jours de culture, les toxines produites dans les grains ont été dosées par HPLC. Pour les dix souches de *F. culmorum*, les résultats du test génétique sont bien corrélés à la production de déoxynivalénol. Pour deux des quatre souches de *F. graminearum*, c’est aussi le cas : deux d’entre elles (INRA A/ CBS185 32, INRA 95/ M01.41) répondent par un “fort potentiel de production de déoxynivalénol” au test génétique *tri5-tri6* et elles sont effectivement capables de produire *in grano* une forte quantité de cette toxine. La troisième souche (INRA 39/ CBS316 73) a une réponse “fort potentiel de production de déoxynivalénol” au test *tri5-tri6* alors qu’elle ne produit pas de déoxynivalénol. La quatrième souche (INRA 91/ M01.32), capable *in grano* de produire du déoxynivalénol et du nivalénol, n’a pas donné de réponse utilisable à notre test *tri5-tri6*, puisque aucune des deux séquences recherchées n’a été détectée. A la lumière de ces résultats, le test *tri5-tri6* apparaît bien corrélé au potentiel de production du déoxynivalénol de *F. culmorum*, mais moins bien pour *F. graminearum*, avec la possibilité que certaines souches de cette seconde espèce restent indéterminées du point de vue de ce test et une surestimation possible des souches de *F. graminearum* de fort potentiel de production de déoxynivalénol.

## 2- Caractérisation des “profils d’espèces” observés sur les grains récoltés

Une des raisons de la variabilité, à l’intérieur d’une même parcelle, de la contamination par les mycotoxines, pourrait être l’hétérogénéité de la population de pathogènes infectants : sans parler de “foyers d’infection” géographiquement localisés dans le champ, comme pour le piétin échaudage, il est possible que tous les épis d’une parcelle donnée ne soient infectés ni par les mêmes espèces de champignons, ni par le même nombre d’individus de chaque espèce de champignons. Avant même de caractériser les profils d’espèces présents sur des parcelles différentes, nous avons donc voulu évaluer

**Tableau 6-2-1 : Identification des agents de la fusariose sur des épis voisins d'une même parcelle (cultivée en système intégré dans l'essai systèmes, en 2001-02)**

Variété	Epi	Nombre de grains par épi	Nombre de souches de <i>Fusarium</i>	Taux d'infection des grains par				
				Tous les <i>Fusarium</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. poae</i>	Autres <i>Fusarium</i>
Apache	1	40	11	28%	6%	11%	0%	11%
	2	38	12	32%	16%	16%	0%	0%
	3	42	10	24%	16%	4%	4%	0%
	4	27	0	0%	0%	0%	0%	0%
	5	12	1	8%	0%	8%	0%	0%
	6	49	4	8%	0%	5%	0%	3%
	8	57	1	2%	0%	0%	0%	2%
	9	61	1	2%	0%	0%	0%	2%
	10	47	2	4%	0%	4%	0%	0%
	Charger	1	52	4	8%	0%	0%	4%
2		57	2	4%	0%	4%	0%	0%
3		43	4	9%	0%	5%	0%	5%
4		38	0	0%	0%	0%	0%	0%
5		48	18	38%	0%	31%	6%	0%
6		37	0	0%	0%	0%	0%	0%
7		41	5	12%	0%	6%	0%	6%
8		63	7	11%	0%	6%	0%	6%
9		33	0	0%	0%	0%	0%	0%
10		45	2	4%	0%	0%	4%	0%

Tous les grains de chaque épi sont mis en culture. La couleur bleue souligne les valeurs les plus fortes de chaque colonne.

**Tableau 6-2-2 : Variabilité du profil d'espèces infectantes sur des épis prélevés en différents endroits de deux parcelles différentes, et contamination en toxines de ces mêmes endroits**

Année, Parcelle	Prélèvement	Déoxynivalénol, µg/kg <sup>a</sup>	Nivalénol, µg/kg <sup>a</sup>	Taux d'infection des grains par					
				<i>Microdochium</i>	Tous les <i>Fusarium</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. poae</i>	Autres <i>Fusarium</i>
2001-02, Parcelle EI	1	2700	<q <sub>l</sub>	5%	17%	1%	11%	2%	3%
	2	1800	<d <sub>l</sub>	4%	22%	1%	10%	3%	8%
	3	2133	<q <sub>l</sub>	5%	12%	1%	6%	3%	2%
	4	2367	<q <sub>l</sub>	3%	21%	2%	12%	2%	5%
	5	1567	<q <sub>l</sub>	2%	17%	1%	10%	3%	3%
	6	1667	<q <sub>l</sub>	6%	19%	1%	8%	5%	5%
2002-03, Parcelle BV	1	180	110	1%	2%	0%	0%	1%	1%
	2	170	<d <sub>l</sub>	2%	3%	0%	1%	2%	0%
	3	160	<d <sub>l</sub>	2%	4%	0%	2%	2%	0%
	4	160	<q <sub>l</sub>	1%	2%	0%	1%	1%	0%
	5	60	<d <sub>l</sub>	2%	0%	0%	0%	0%	0%
	6	140	<d <sub>l</sub>	0%	4%	0%	4%	0%	0%
	7	60	<d <sub>l</sub>	0%	1%	0%	1%	0%	0%
	8	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	1%	1%	0%	0%	1%	0%
	9	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	1%	1%	0%	0%	1%	0%

<d<sub>l</sub> teneur inférieure à la limite de détection (30 µg/kg), <q<sub>l</sub> teneur inférieure à la limite de quantification (60 µg/kg). <sup>a</sup>dosage pas GC-MS.

La couleur bleue (ou verte) souligne les valeurs les plus fortes (ou faibles) d'une colonne, pour une condition donnée.

la variabilité de ces profils à l'intérieur d'une parcelle donnée. Sur quelques unes de nos parcelles, nous avons alors entrepris d'estimer la variabilité des champignons trouvés sur différents épis : ou bien des épis voisins, c'est-à-dire situés dans une même zone de la parcelle (section 2.1), ou bien des épis plus éloignés, situés dans différentes zones de la même parcelle (section 2.2).

### 2.1- Sur des épis voisins

Les grains provenant de 19 épis voisins (compris dans 0,2 m<sup>2</sup> environ) d'une parcelle ont été mis en culture. Aucune souche de *Microdochium* n'a été détectée après cette culture, mais on a constaté une forte variabilité du nombre de souches de *Fusarium* présentes par épi (**Tableau 6-2-1**) : selon l'épi, de 0 à 18 souches de *Fusarium* ont pu être retrouvées au total sur les différents grains infectés, touchant de 0 à 38% des grains de l'épi. Ces souches se répartissent en souches d'espèces non toxigènes (*F. proliferatum*, *F. tricinctum*, *F. moniliforme* et *F. sp.*, qui peuvent contaminer jusqu'à 11% des grains d'un épi), et en souches d'espèces toxigènes (*F. culmorum* jusqu'à 16%, *F. graminearum* jusqu'à 31% et *F. poae*, jusqu'à 4 %). Ces résultats confirment l'hétérogénéité de l'infection des épis, que ce soit en terme de nombre de souches infectantes ou en terme de types de souches différentes, même à l'intérieur d'une petite zone (0,2 m<sup>2</sup> environ) d'un champ cultivé. Ils soulignent la nécessité d'un bon échantillonnage pour l'analyse mycologique.

### 2.2- Sur des épis éloignés à l'intérieur d'une même parcelle

La variabilité d'infection entre des épis collectés dans des zones différentes (espacées de 40 à 60 m<sup>2</sup>) d'une parcelle (**Tableau 6-2-2**), semble du même ordre de grandeur que la variabilité précédemment décrite entre épis voisins. En effet, les taux d'infection par *Fusarium*, toutes souches confondues, varient de 12 à 22% sur la parcelle EI et de 0 à 4% sur la parcelle BV (**Tableau 6-2-2**), quand elles variaient de 0 à 38% entre épis voisins (**Tableau 6-2-1**). A l'intérieur de chacune de ces parcelles, la teneur en déoxynivalénol n'apparaît pas très fortement corrélée aux taux d'infection par *F. graminearum* et *F. culmorum* (seules espèces potentiellement productrices de cette toxine, **Figure 6-2-1a**). Sur la parcelle BV, les taux d'infection de l'ensemble des *Fusarium* semble plus positivement liés à la contamination par déoxynivalénol, sans que la relation soit très nette (**Figure 6-2-1b**). Les deux parcelles ont toutefois des taux moyens de contamination et d'infection assez différents. On remarquera d'ailleurs que le très fort niveau de contamination par déoxynivalénol de la parcelle EI semble être bien confirmé par la répétition des dosages de la toxine sur les différents prélèvements réalisés, qui présentent tous au moins le même ordre de grandeur. Une première comparaison entre les deux parcelles utilisées pour cette analyse peut être faite. Les taux d'infection par *Fusarium*, toutes espèces confondues, et aussi, dans une moindre mesure, les taux d'infection par *Microdochium*, sont plus importants dans la parcelle EI en 2001-02 que dans la parcelle BV en 2002-03 ; c'est encore plus vrai pour *F. graminearum* seul : dans un premier temps, on peut supposer que ces taux d'infection plus importants sont bien à l'origine des niveaux de contamination par déoxynivalénol, eux aussi beaucoup plus forts dans la parcelle EI que dans la parcelle BV.

Plusieurs pistes peuvent être envisagées pour mieux expliquer les niveaux de contamination de ces deux parcelles, à savoir : (i) la présence sur la parcelle EI de souches plus productrices que celles présentes sur la parcelle BV, (ii) il est également possible que *F. culmorum* et *F. graminearum* entrent en compétition avec d'autres champignons présents sur les grains : si la production de déoxynivalénol augmente en présence d'autres *Fusarium* que les espèces productrices (comme cela semble être le cas dans la parcelle BV), on peut facilement imaginer que le reste de la flore des grains puisse lui aussi intervenir en stimulant la production de cette mycotoxine. Nous reviendrons sur ces hypothèses lors de l'analyse des résultats obtenus sur l'ensemble des dispositifs.

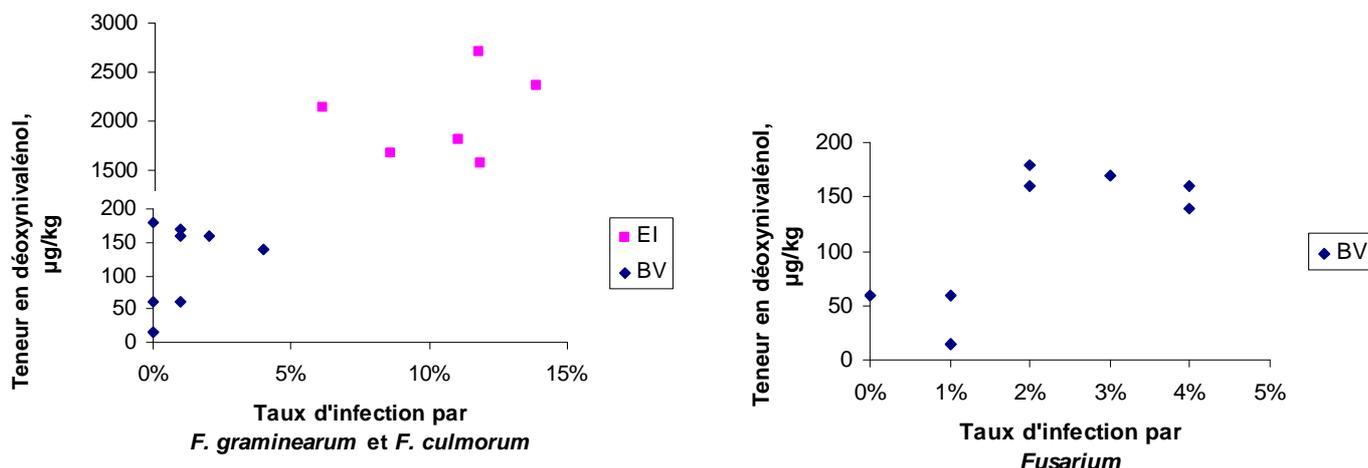
### 2.3- Sur des épis prélevés dans différentes parcelles, du réseau ou de l'essai systèmes

Le **Tableau 6-2-3** et le **Figure 6-2-2** résument les taux d'infection des grains observés (sur 300 ou 100

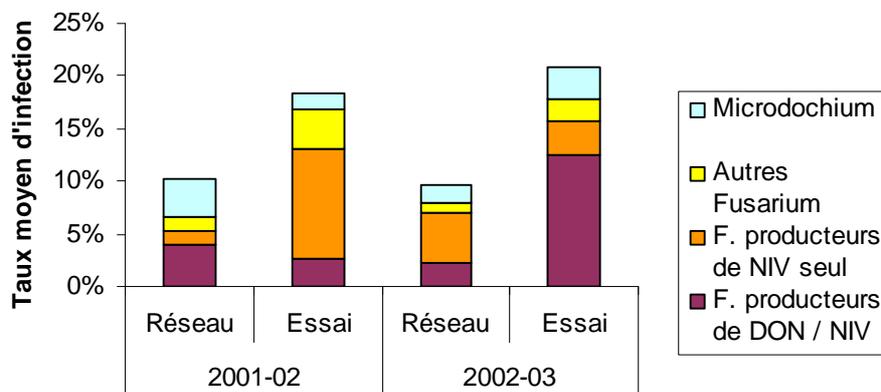
**Figure 6-2-1 : Influence du taux d'infection des épis sur les niveaux de contamination des grains par déoxynivalénoïl**

a- *F. graminearum* et *F. culmorum*

b- L'ensemble des *Fusarium*



**Figure 6-2-2 : Profil des espèces infectantes**



Les résultats correspondent aux moyennes des taux d'infection rencontrés sur les différentes parcelles lors des deux années d'étude. Les *Fusarium* producteurs de déoxynivalénoïl et/ou nivalénoïl sont *F. graminearum* et *F. culmorum*. En 2001-02, les *Fusarium* producteurs exclusifs de nivalénoïl sont *F. poae* et *F. crookwellense* ; les autres *Fusarium* sont *F. moniliforme*, *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichoides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. sp.* En 2002-03, les *Fusarium* producteurs exclusifs de nivalénoïl sont *F. poae* et *F. equiseti* ; les autres *Fusarium* sont *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. lateritium*.

**Tableau 6-2-3 : Taux d'infection des grains par les différents groupes d'espèces du complexe fusarien, et comparaison avec symptômes d'attaque (observés sur les épis) et contamination en toxines (mesurée dans les grains)**

a- Dans les différentes parcelles de notre réseau en agriculture biologique

Année	Parcelle	Niveaux <sup>e</sup> d'attaque par la fusariose		Niveaux <sup>e</sup> de contamination <sup>a</sup> par		Taux d'infection des grains par			
		Intensité	Gravité	Nivalénol µg/kg	Déoxynivalénol µg/kg	<i>Microdochium</i>	Autres <i>Fusarium</i> <sup>b</sup>	<i>Fusarium</i> <sup>c</sup> producteurs de déoxynivalénol ou nivalénol	<i>Fusarium</i> <sup>d</sup> producteurs de nivalénol
2001-02	AI	0%	0%	<d <sub>i</sub>	180	7%	0%	4%	5%
	AII	13%	7%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	7%	1%	4%	5%
	AIII	17%	1%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	4%	2%	1%	3%
	BI	2%	0%	<q <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	2%	2%	3%	4%
	BII	13%	10%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0%	3%	0%	3%
	BIII	17%	3%	<d <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	12%	2%	4%	6%
	BIV	23%	1%	140	60	8%	5%	12%	14%
	CI	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	0%	1%	5%	5%
	CII	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	2%	0%	4%	6%
	CIII	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	1%	2%	1%	2%
	CIV	3%	0%	120	<d <sub>i</sub>	5%	1%	4%	6%
	DI	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<q <sub>i</sub>	3%	0%	1%	1%
	DII	100%	44%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	1%	1%	8%	9%
	DIII	66%	15%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	2%	0%	3%	5%
	DIV	20%	2%	<d <sub>i</sub>	60	2%	0%	3%	3%
	EI	30%	5%	<q <sub>i</sub>	2250	4%	3%	10%	12%
EII	0%	0%	<d <sub>i</sub>	190	2%	0%	2%	3%	
2002-03	AIV	23%	2%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	4%	0%	3%	7%
	BV	0%	0%	<d <sub>i</sub>	120	1%	0%	2%	2%
	BVI	0%	0%	<q <sub>i</sub>	200	0%	0%	3%	5%
	BVII	20%	1%	<q <sub>i</sub>	60	0%	0%	0%	9%
	BVIII	33%	2%	80	70	0%	0%	0%	12%
	CV	37%	3%	90	200	2%	3%	3%	18%
	CVI	0%	0%	<d <sub>i</sub>	260	0%	0%	0%	3%
	DV	17%	1%	<d <sub>i</sub>	180	4%	0%	5%	5%
	DVI	3%	0%	<d <sub>i</sub>	210	0%	0%	0%	0%
	EIII	0%	0%	<d <sub>i</sub>	270	3%	3%	5%	6%
EIV	20%	1%	<d <sub>i</sub>	850	2%	2%	7%	9%	
EV	20%	2%	<d <sub>i</sub>	450	5%	3%	0%	8%	
EVI	0%	0%	<d <sub>i</sub>	<d <sub>i</sub>	1%	2%	1%	6%	

Toutes les parcelles commençant par la même lettre sont cultivées dans la même exploitation.

<sup>a</sup> <d<sub>i</sub> teneur inférieure à la limite de détection (30 µg/kg), <q<sub>i</sub> teneur inférieure à la limite de quantification (60 µg/kg).

<sup>b</sup> En 2001-02, les autres *Fusarium* présents sont *F. moniliforme*, *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichoides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. sp.*; en 2002-03, ce sont *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. lateritium*.

<sup>c</sup> *F. culmorum* et *F. graminearum* sont les producteurs potentiels de déoxynivalénol ou nivalénol.

<sup>d</sup> *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. equiseti* et *F. crookwellense* sont les producteurs potentiels de nivalénol.

<sup>e</sup> Niveaux repris du tableau 5-1-10.

La couleur bleue (ou verte) souligne les valeurs les plus fortes (ou faibles) d'une colonne, pour une année donnée.

b- Sur l'essai systèmes de longue durée

Année	Système de culture	Bloc	Niveaux <sup>e</sup> d'attaque par la fusariose		Niveaux <sup>e</sup> de contamination <sup>a</sup> par		Taux d'infection des grains par				
			Intensité	Gravité	Nivalénol µg/kg	Déoxynivalénol µg/kg	<i>Microdochium</i>	Autres <i>Fusarium</i> <sup>b</sup>	<i>Fusarium</i> <sup>c</sup> producteurs de déoxynivalénol ou nivalénol	<i>Fusarium</i> <sup>d</sup> producteurs de nivalénol	
<b>“Cohérent”</b>											
2001-02	Conventionnel	I	26%	3%	<d <sub>1</sub>	150	1%	5%	6%	11%	
		II	13%	1%	<d <sub>1</sub>	380	1%	7%	12%	14%	
	Intégré	I	2%	0%	<d <sub>1</sub>	<d <sub>1</sub>	0%	1%	1%	1%	
		II	3%	0%	<d <sub>1</sub>	280	0%	4%	8%	8%	
	Sans travail du sol	I	17%	1%	80	400	1%	1%	9%	13%	
		II	3%	0%	<d <sub>1</sub>	600	0%	8%	22%	27%	
	Biologique	I	1%	0%	<d <sub>1</sub>	100	3%	1%	5%	5%	
		II	1%	0%	<d <sub>1</sub>	110	1%	5%	10%	10%	
	<b>Autre variété cohérente : Renan (variété des agriculteurs)</b>										
	Biologique	I	2%	0%	<d <sub>1</sub>	140	2%	2%	9%	13%	
		II	3%	0%	<d <sub>1</sub>	240	0%	0%	0%	0%	
	<b>“Contrôle” (Variété Charger, sans fongicide)</b>										
	Conventionnel	I	21%	4%	<q <sub>1</sub>	310	0%	3%	14%	18%	
		II	12%	1%	<q <sub>1</sub>	340	0%	3%	9%	13%	
Intégré	I	16%	2%	<d <sub>1</sub>	310	4%	6%	13%	17%		
	II	29%	2%	80	340	2%	4%	20%	24%		
Sans travail du sol	I	41%	5%	90	800	3%	7%	17%	20%		
	II	24%	3%	80	1100	0%	4%	11%	14%		
Biologique	I	39%	5%	<d <sub>1</sub>	600	6%	4%	7%	9%		
	II	29%	3%	60	600	2%	0%	3%	6%		
<b>“Cohérent”</b>											
2002-03	Conventionnel	I	66%	9%	<q <sub>1</sub>	190	4%	4%	3%	31%	
		II	32%	4%	<q <sub>1</sub>	250	4%	0%	2%	10%	
	Intégré	I	36%	4%	80	650	4%	0%	5%	19%	
		II	40%	4%	70	380	0%	1%	1%	15%	
	Sans travail du sol	I	10%	3%	<q <sub>1</sub>	600	2%	5%	5%	8%	
		II	30%	5%	70	700	3%	1%	11%	23%	
	Biologique	I	12%	1%	<q <sub>1</sub>	110	0%	2%	2%	13%	
		II	12%	1%	<q <sub>1</sub>	<q <sub>1</sub>	0%	1%	2%	20%	
	<b>Autre variété cohérente : Renan (variété des agriculteurs)</b>										
	Biologique	I	4%	0%	<d <sub>1</sub>	60	1%	3%	0%	5%	
		II	8%	1%	<d <sub>1</sub>	<q <sub>1</sub>	0%	4%	1%	13%	
	<b>“Contrôle” (Variété Charger, sans fongicide)</b>										
	Conventionnel	I	66%	9%	120	250	11%	2%	2%	27%	
		II	56%	8%	<q <sub>1</sub>	250	0%	3%	6%	17%	
Intégré	I	62%	10%	80	430	10%	2%	7%	12%		
	II	58%	7%	80	230	6%	1%	2%	12%		
Sans travail du sol	I	40%	6%	80	550	2%	3%	1%	6%		
	II	64%	13%	140	680	1%	4%	4%	22%		
Biologique	I	30%	3%	<q <sub>1</sub>	110	1%	1%	0%	5%		
	II	24%	2%	70	110	2%	2%	1%	18%		

<sup>a</sup> <d<sub>1</sub> teneur inférieure à la limite de détection (30 µg/kg), <q<sub>1</sub> teneur inférieure à la limite de quantification (60 µg/kg).

<sup>b</sup> En 2001-02, les autres *Fusarium* présents sont *F. moniliforme*, *F. avenaceum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichoides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum*, *F. sp.*; en 2002-03, ce sont *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. lateritium*.

<sup>c</sup> *F. culmorum* et *F. graminearum* sont les producteurs potentiels de déoxynivalénol ou nivalénol.

<sup>d</sup> *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. equiseti* et *F. crookwellense* sont les producteurs potentiels de nivalénol.

<sup>e</sup> Niveaux repris du tableau 5-2-6.

La couleur bleue (ou verte) souligne les valeurs les plus fortes (ou faibles) d'une colonne, pour une année donnée.

grains selon l'année) dans les différentes parcelles suivies, en distinguant les différents groupes d'espèces du complexe fusarien. Si on porte les moyennes de ces résultats sous forme d'histogrammes, le profil des espèces du complexe fusarien ayant attaqué les cultures semble clairement différent d'une année sur l'autre (**Figure 6-2-2**). Quand on considère conjointement les résultats de nos deux dispositifs, le taux d'infection par les espèces de *Fusarium* génétiquement capables de produire du déoxynivalénol et du nivalénol (*F. graminearum* et *F. culmorum*) est significativement plus importante en 2001-02 qu'en 2002-03 ( $\alpha < 0,001$ ). A l'inverse, le taux d'infection par *F. poae* (producteur potentiel de nivalénol seulement) est significativement plus important en 2002-03 qu'en 2001-02 ( $\alpha < 0,0001$ ). On peut également noter que les espèces de autres *Fusarium* ont été un peu plus présentes en 2001-02 qu'en 2002-03 ( $\alpha < 0,1$ ), avec notamment une forte présence de *F. avenaceum* et de *F. tricinctum*.

Dans les parcelles du réseau (**Tableau 6-2-3a**), les taux d'infection des grains par *F. graminearum* et *F. culmorum*, producteurs potentiels de déoxynivalénol et de nivalénol, varient de 0 à 12% selon les parcelles en 2001-02, et de 0 à 7% selon les parcelles en 2002-03. Les taux d'infection par l'ensemble des espèces potentiellement productrices de nivalénol (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. equiseti* et *F. crookwellense*) varient de 1 à 14% en 2001-02 et de 0 à 18% en 2002-03. Dans les deux cas, la différence entre les deux années ne semble pas significative d'un point de vue statistique (sauf pour *F. poae* seul, significativement plus présent en 2002-03 qu'en 2001-02,  $\alpha < 0,05$ ). De même, les taux d'infection par les autres *Fusarium* sont similaires d'une année sur l'autre (et faibles : de 0 à 5% en 2001-02 et de 0 à 3% en 2002-03). Enfin, les infections par *Microdochium* s'étendent de 0 à 12% en 2001-02 et de 0 à 5% de grains infectés en 2002-03, ce qui ne témoigne que d'un faible "effet année" ( $\alpha < 0,1$ ).

Dans les parcelles de l'essai systèmes (**Tableau 6-2-3b**), globalement, aussi bien les autres *Fusarium* que les *Fusarium* potentiellement producteurs de déoxynivalénol et nivalénol sont plus nombreux en 2001-02 qu'en 2002-03, de façon statistiquement significative (respectivement  $\alpha < 0,05$  et  $\alpha < 0,001$ ). Comme sur le réseau, les cultures sont, à l'inverse, plus infectées par *F. poae* en 2002-03 qu'en 2001-02 ( $\alpha < 0,001$ ). Notons aussi que dans les parcelles conduites de façon cohérente, les taux d'infection par *Microdochium* sont significativement plus faibles que dans les parcelles "contrôle" conduites sans cette cohérence, quel que soit le système de culture. Aucune différence significative n'est observée entre les deux blocs.

De plus (**Tableau 6-2-4**), on peut noter une relativement grande proportion de parcelles (18 sur 66) ne présente aucune attaque sur l'échantillon de grains utilisé, et les niveaux d'infection sont généralement faibles. Un peu moins de 40% des parcelles (25 sur 66) ont été infectées avec des souches potentiellement productrices de déoxynivalénol et de nivalénol, et un peu plus de 30% (25 parcelles sur 66) ont été infectées avec des souches potentiellement productrices de nivalénol seul. Les pourcentages d'infection des espèces n'apparaissent pas corrélés entre eux : aucune structuration des populations n'est donc mise en évidence.

Le **Tableau 6-2-3 a et b** présente également, pour les différentes parcelles, les quantités de toxines qui ont été mesurées dans les grains ainsi que les symptômes de fusariose apparus sur les épis. Ces dernières données ont été déjà utilisées dans le chapitre 5, et seront rediscutées plus loin, mais on peut remarquer ici que les parcelles du réseau présentant des symptômes d'attaque importants (DII, DIII) ou des contaminations en mycotoxines élevées (EI) ne présentent pas forcément les taux d'infection les plus élevés. Il semble que de nouveau nous n'arrivons pas à expliquer complètement ces niveaux d'attaque et de contamination exceptionnellement élevés parmi nos résultats.

#### 2.4- Effet des pratiques culturales sur les profils d'espèces infectantes

Sur notre réseau de parcelles, contrairement à l'espoir explicite de cette thèse, nous n'avons pas pu

**Tableau 6-2-4 : Nombres de parcelles dans les différents types de profils rencontrés**

<i>F. graminearum</i> + <i>F. culmorum</i>	<i>F. poae</i> + <i>F. equiseti</i> + <i>F. crookwellense</i>	<i>Microdochium</i> et autres <i>Fusarium</i>	
		de 0% à 5% d'infection	de 5% à 15% d'infection
de 0% à 5% d'infection	de 0% à 5% d'infection	20 <sup>a</sup>	3
	de 5% à 15% d'infection	10	2
	de 15% à 25% d'infection	4	0
	de 25% à 35% d'infection	1	1
de 5% à 15% d'infection	de 0% à 5% d'infection	12	6
	de 5% à 15% d'infection	3	1
de 15% à 25% d'infection	de 0% à 5% d'infection	1	2

<sup>a</sup> 18 parcelles ne présentent aucune contamination.

mettre en évidence de relation statistiquement significative entre différents itinéraires techniques (à l'intérieur d'un système commun d'agriculture biologique, c'est-à-dire dans le réseau de parcelles). Ce sont, probablement, les trop faibles niveaux d'infection de nos parcelles qui sont la cause principale de cette impossibilité. En effet, il apparaît dans le **Tableau 6-2-3 (a versus b)** que les grains des parcelles du réseau sont largement moins infectés que ceux des parcelles de l'essai systèmes. Ceci rejoint l'observation faite dans le chapitre précédent, et visible également dans le **Tableau 6-2-3** : les niveaux d'attaque et de contamination sont eux aussi globalement plus faibles sur le réseau que sur l'essai systèmes. Une analyse de variance confirme (données non montrées) que les espèces non toxigènes et les principales espèces toxigènes (*F. culmorum*, *F. graminearum* et *F. poae*) de *Fusarium* sont plus présentes sur l'essai systèmes que sur le réseau.

Sur l'essai (**Tableau 6-2-3b**), par contre, un classement des systèmes de culture peut être fait. Ainsi, dans les deux types de conduite des systèmes de culture, le système de culture biologique présente un taux d'infection par les agents responsables de la fusariose (et notamment l'ensemble des *Fusarium*) plus faible que les autres systèmes de culture ( $\alpha < 0,01$ ). Dans l'ordre des infections croissantes, on trouve ensuite le système intégré, puis les systèmes conventionnel et sans travail du sol avec couverture permanente (qui sont infectés de façon comparable). Ces résultats sont de nouveau à mettre en relation avec ceux obtenus dans le chapitre 5, où le système "biologique" s'avérait être le moins attaqué des systèmes, et le système "sans travail du sol" celui qui était le plus contaminé. Néanmoins, dans le détail (c'est-à-dire quand on regarde par année et par type de conduite), la corrélation entre taux d'infection et niveaux d'attaque ou de contamination n'est pas excellente.

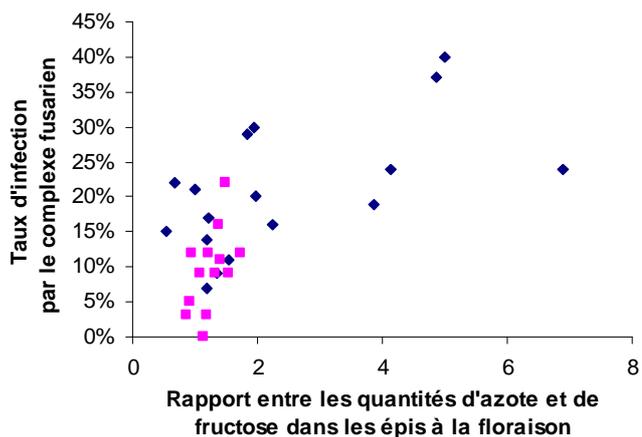
*F. culmorum* est une espèce faiblement présente (taux d'infection compris entre 0 et 4%) que l'on pourrait envisager de négliger au vu des taux d'infection par *F. graminearum* (champignon également potentiellement producteur des mêmes mycotoxines, mais nettement plus présent sur nos parcelles). Néanmoins, bien que ceci ne soit pas détaillé dans le **Tableau 6-2-3**, *F. culmorum* est significativement plus présente sur les systèmes de culture intégré et sans travail du sol avec couverture permanente que sur les autres systèmes de l'essai ( $\alpha < 0,05$ , toutes années et tous types de conduites confondus). Ceci est notamment vrai en 2002-03 où, à l'exception de la parcelle du système intégré conduite de façon cohérente dans le bloc I, aucun autre système que celui sans travail du sol avec couverture permanente ne présente de *F. culmorum*. Or, le système sans travail du sol avec couverture permanente est celui qui est le plus contaminé des systèmes (**Chapitre 5**). Par conséquent, il semble possible que la présence de cette espèce soit un des éléments susceptibles d'expliquer les très forts taux de contamination observés dans ce système. On notera d'ailleurs que cette espèce est bien présente sur la parcelle EI du réseau (**Tableau 6-2-2**), elle aussi très fortement contaminée. Toutefois, sur l'ensemble des résultats, il n'y a pas de corrélation évidente entre *F. culmorum*, pris seul, et la contamination des grains.

*A priori*, la pratique agricole qui devrait influencer le plus le niveau d'infection des grains est l'application d'une protection fongicide sur la parcelle. Dans l'essai systèmes, la comparaison entre les parcelles du système de culture conventionnel (traitées de façon "cohérente", ou "contrôle", c'est-à-dire avec ou sans fongicide, **Tableau 6-2-3b**) ne permet pas de discerner d'effet évident du fongicide : le traitement serait donc passablement inefficace de ce point de vue. Néanmoins, ces résultats ne portent que sur quatre parcelles, ce qui est très peu ; ils demandent donc à être complétés. Sur l'ensemble de l'essai, un effet fongicide peut être observé sur les taux d'infection par les différentes espèces de *Fusarium* ( $\alpha < 0,05$  pour l'ensemble des *Fusarium*, les autres *Fusarium* et *F. graminearum*).

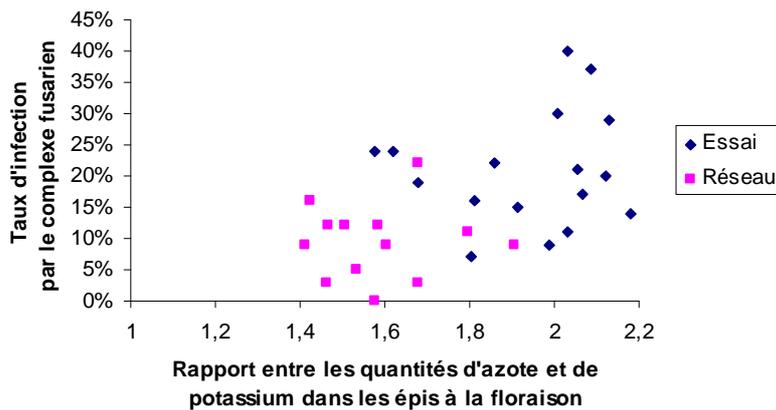
*A priori*, on peut aussi imaginer que le profil des espèces infectantes dépende des variétés de blé cultivées (en raison du type de résistance, du port et/ou de l'état nutritionnel de la variété). La comparaison des trois variétés cultivées en système biologique (*Apache* et *Renan* en système cohérent, et *Charger* en système "contrôle") montre que les niveaux d'infection par *Microdochium* sont

**Figure 6-2-3 : Relation entre le taux d'infection des grains par le complexe fusarien et la nutrition des épis à la floraison en 2002-03**

a- Selon le rapport des teneurs en azote et en fructose



b- Selon le rapport des teneurs en azote et en potassium



significativement supérieurs sur la variété *Charger* que sur les autres variétés ( $\alpha < 0,1$ , **Tableau 6-2-3b**). La variété *Renan* semble, quant à elle, moins infectée que les deux autres variétés.

Outre les traitements fongicides et le type de variété, d'autres paramètres, plus mineurs, pourraient influencer les profils d'espèces. Ainsi, le type de sol et le travail du sol pourraient influencer les compétitions entre les espèces de champignons, en modifiant l'aération du sol et la densité des résidus et donc, du même coup, les conditions de survie et de conservation des champignons. La comparaison des profils d'espèces sur le système intégré *versus* le système sans travail du sol indique que le travail du sol augmente significativement les taux d'infection par *Microdochium* sur la variété *Charger* ( $\alpha < 0,1$ ), mais diminue significativement le taux d'infection de *F. culmorum* sur le mélange variétal ( $\alpha < 0,01$ ).

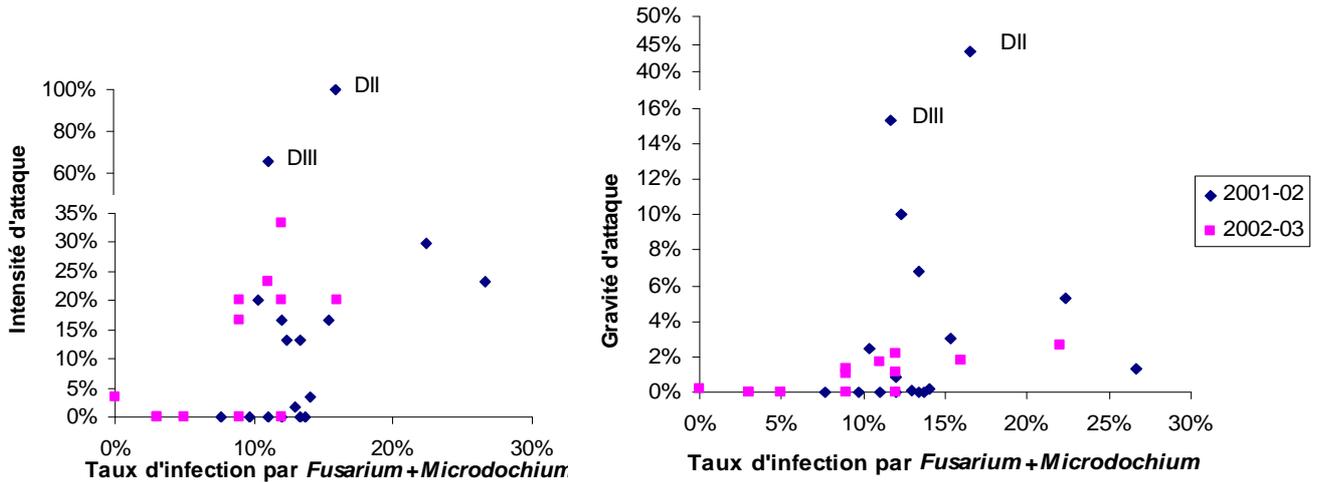
Par ailleurs, malgré l'observation en laboratoire de différentes capacités de dispersion par splashing pour les différentes espèces de *Fusarium* (**Chapitre 1**), nous n'observons sur nos parcelles aucun effet de la densité des cultures (données non montrées). Par contre, sur l'ensemble des parcelles suivies sur 2002-03 (les seules pour lesquelles nous ayons des données complètes, le rapport entre la teneur en azote et la teneur en fructose des épis à la floraison (rapport dont nous avons vu au chapitre 5 qu'il était bien lié aux niveaux d'attaque) semble bien relié aux taux d'infection par l'ensemble des espèces du complexe fusarien (**Figure 6-2-3a**). Il en va de même, quoique dans une moindre mesure, pour le rapport entre les teneurs en azote et en potassium dans les épis à la floraison (rapport dont nous avons vu au chapitre 5 qu'il était lié aux niveaux de contamination par déoxynivalénol) (**Figure 6-2-3b**). La nutrition des épis semble donc bien être impliquée dans l'infection des grains par les champignons du complexe fusarien.

## 2.5- Discussion

Les carences nutritives des parcelles en système biologique pourraient entraîner de plus faibles taux d'infection pour ces parcelles, par rapport à d'autres mieux alimentées (**Figure 6-2-3**). Ce résultat appelle deux remarques : une sur la relation symptômes-infection, que nous détaillerons dans la partie suivante, et une sur la faiblesse des niveaux d'infection en agriculture biologique. Les plus faibles niveaux d'infection en système biologique semblent, à première vue, contradictoires avec l'idée que l'absence de traitement fongicide (en système biologique) devrait être corrélée à une plus grande quantité de champignons sur les cultures. Cependant, le paradoxe n'est qu'apparent, puisque nous n'avons évalué dans notre travail que les espèces de champignons à l'origine de la fusariose : en absence de traitement fongicide, les autres espèces de champignons pourraient être beaucoup plus présentes et entrer en compétition avec les *Fusarium* et les *Microdochium* du complexe fusarien. Une analyse génétique de l'ensemble de la flore mycologique présente sur les grains pourrait permettre de tester cette hypothèse, comme cela est fait sur l'algue *Halophila stipulacea* (Weidner *et al.*, 1996).

Nous avons vu précédemment que de forts taux de nutrition azotée en cas de faibles taux en fructose dans les épis à la floraison sont corrélés à la fois à des symptômes forts de fusariose sur les épis (**Figure 5-1-8**) et à des taux d'infection des grains par l'ensemble du complexe fusarien également élevés (**Figure 6-2-3**). Bien que l'état nutritionnel du blé puisse peut-être influencer la résistance de cette plante, il influe plus probablement sur le développement des agents responsables de la fusariose, qui se développent sur l'épi, ce qui se répercuterait ensuite sur l'attaque voire la contamination des grains. Nutrition des plantes (azote et fructose) et résistance variétale vis-à-vis des espèces du complexe fusarien pourraient être deux éléments déterminants pour expliquer les bas niveaux d'infection des parcelles en systèmes biologiques, par rapport aux parcelles en système conventionnel. Ces résultats étant issus d'une expérimentation en un seul lieu sur deux années seulement, ils demandent évidemment à être confirmés.

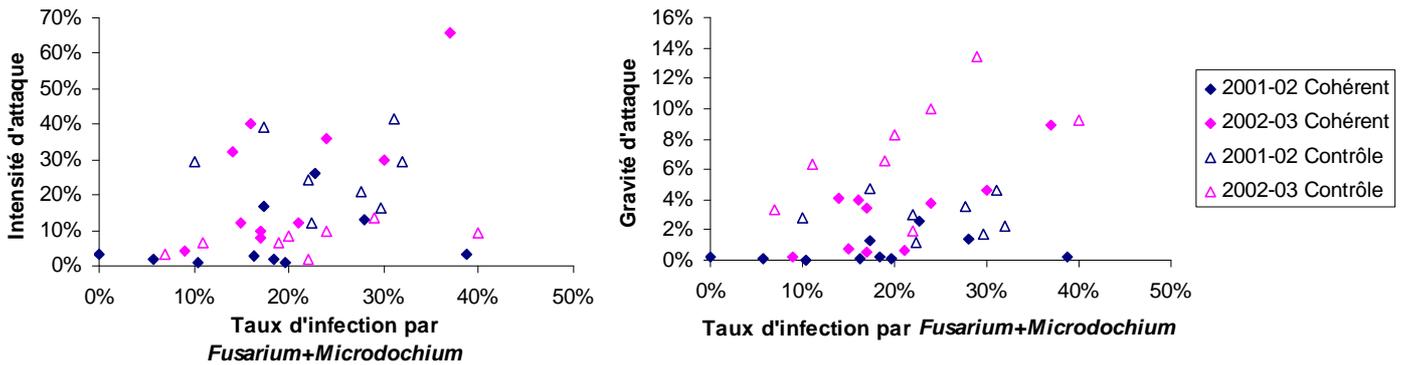
**Figure 6-3-1 : Relation entre les niveaux d'attaque et le taux d'infection sur les parcelles agricoles**  
 a- Intensité d'attaque des épis      b- Gravité d'attaque des épis



**Figure 6-3-2 : Relation entre les niveaux d'attaque et le taux d'infection des grains, dans l'essai systèmes**

a- Intensité d'attaque des épis

b- Gravité d'attaque des épis



### 3- Relation entre les espèces présentes sur les grains et les symptômes de fusariose sur les épis

Les relations entre profils d'espèces infectantes et développement des symptômes ou production de toxines seront ici analysés dans nos différents dispositifs (réseau ou essai systèmes), en fonction de la cohérence des conduites culturales (sur l'essai systèmes), ainsi qu'en fonction de l'application ou non d'un traitement fongicide. Nous ne disposons pas d'un assez grand nombre de parcelles dans les différentes situations pour tester sérieusement les effets de la variété cultivée, du précédent cultural, du type de sol et/ou de la densité de peuplement sur ces relations ; nous indiquons néanmoins qu'il est très probable que ces pratiques aient également un impact sur les profils d'espèces infectantes, et donc sur la capacité potentielle des champignons à produire des toxines.

#### 3.1- Effets des systèmes de culture

Les relations entre les niveaux d'attaque des épis (intensité et gravité) et les taux d'infection des grains par l'ensemble des champignons du complexe fusarien (*Microdochium* et *Fusarium*) sont représentées sur les **Figures 6-3-1** et **6-3-2**, respectivement pour les parcelles du réseau et celles de l'essai systèmes. L'ensemble des résultats des analyses statistiques décrites dans cette partie est repris dans le **Tableau 6-3-1**. Il y a une certaine corrélation entre les taux d'infection par *Microdochium* et *Fusarium* et les niveaux d'attaque par la maladie (intensité ou gravité), mais faible.

Pour le réseau de parcelles, une des raisons de la faiblesse des corrélations réside dans les niveaux d'attaque des parcelles DII et DIII, qui sont très élevés par rapport à leurs niveaux d'infection. Ce résultat est particulièrement troublant. Si on fait l'hypothèse que les résultats apparemment exceptionnels de ces parcelles résultent d'une confusion des symptômes de fusariose avec les symptômes d'une attaque de saprophytes (ou d'un échaudage précoce), on est conduit à éliminer ces parcelles. Sans ces deux parcelles, les taux d'infection de l'ensemble des espèces ont bien un effet plus significatif (**Tableau 6-3-1**) sur les niveaux d'attaque. Même après cela, cependant, les relations ne sont pas très strictes : moins de la moitié de la variabilité des niveaux d'attaque (30% pour l'intensité et 20% pour la gravité) est expliquée par les différents taux d'infection. A l'inverse, il se pourrait que les résultats les plus significatifs de notre étude soient précisément ceux apportés par les parcelles DII et DIII, mais nous n'avons pas les moyens de l'estimer.

Sur les deux dispositifs, un seuil de 9% d'infection semble par ailleurs exister : en deçà de ce seuil les attaques ne semblent pas vraiment visibles. Mais ceci est sans doute lié au système de notation que nous avons adopté (nous n'avons considéré comme atteints que les épillets dont plus d'un tiers de la surface était attaquée).

A l'intérieur de l'essai, la manière de conduire les systèmes de culture (de façon cohérente ou non) semble intervenir sur les relations : pour un même niveau d'infection, les niveaux d'attaque (tant d'intensité que de gravité) sont le plus souvent inférieurs en conduite cohérente qu'en conduite "contrôle", à l'exception des niveaux d'intensité d'attaque de 2002-03 (**Figure 6-3-2**). La distinction des deux types de conduites, conjointement avec une distinction des années culturales, permet d'améliorer les relations précédemment obtenues (**Figure 6-3-2, Tableau 6-3-1**). Ces résultats laissent supposer que les traitements fongicides, entre autres effets, pourraient modifier les relations obtenues.

#### 3.2- Effet des traitements fongicides

Les parcelles de l'essai-systèmes, traitées ou non par des fongicides, permettent de mettre en évidence qu'en présence de traitements fongicides, les niveaux d'intensité et de gravité d'attaque sont peu liés à l'ensemble du complexe fusarien. La corrélation est cependant meilleure si on ne considère que *F. poae* (**Tableau 6-3-1, Figures 6-3-3**).

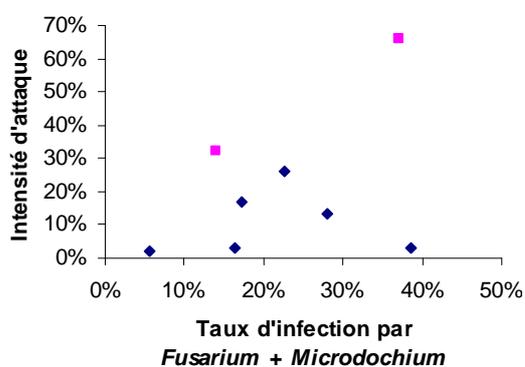
**Tableau 6-3-1 : Résultats des régressions linéaires entre les taux d'infection des grains par différents groupes d'espèces infectantes et les niveaux d'attaque**

Champignons responsables	Toutes données	Réseau (Sans fongicide)	Essai systèmes					Réseau et essai sans fongicides
			Tous	Cohérent	“Contrôle”	Sans fongicide <sup>a</sup>	Avec fongicides	
<b>Intensité d'attaque</b>								
Complexe	R <sup>2</sup> =0,18 ****	R <sup>2</sup> =0,17 **	R <sup>2</sup> =0,15 **	R <sup>2</sup> =0,23 **	R <sup>2</sup> =0,05 ns	R <sup>2</sup> =0,21 **	R <sup>2</sup> =0,15 ns	R <sup>2</sup> =0,24 ****
Complexe, sans DII, DIII	R <sup>2</sup> =0,27 ****	R <sup>2</sup> =0,33 ***						R <sup>2</sup> =0,36 ****
Complexe sauf <i>F. culmorum</i> et <i>F. graminearum</i> , sans DII et DIII	<b>R<sup>2</sup>=0,46</b> ****	R <sup>2</sup> =0,34 ***	<b>R<sup>2</sup>=0,41</b> ****	R <sup>2</sup> =0,60 ****	R <sup>2</sup> =0,29 **	<b>R<sup>2</sup>=0,35</b> ***	R <sup>2</sup> =0,69 ***	<b>R<sup>2</sup>=0,44</b> ****
<i>F. poae</i> , sans DII et DIII	R <sup>2</sup> =0,44 ****	<b>R<sup>2</sup>=0,39</b> ****	R <sup>2</sup> =0,38 ****	<b>R<sup>2</sup>=0,63</b> ****	<b>R<sup>2</sup>=0,34</b> **	R <sup>2</sup> =0,23 ***	<b>R<sup>2</sup>=0,88</b> ****	R <sup>2</sup> =0,37 ****
<b>Gravité d'attaque</b>								
Complexe	R <sup>2</sup> =0,04 ns	R <sup>2</sup> =0,06 ns	R <sup>2</sup> =0,14 **	R <sup>2</sup> =0,25 **	R <sup>2</sup> =0,05 ns	R <sup>2</sup> =0,19 **	R <sup>2</sup> =0,16 ns	R <sup>2</sup> =0,05 *
Complexe, sans DII, DIII	R <sup>2</sup> =0,19 ****	R <sup>2</sup> =0,12 *						R <sup>2</sup> =0,25 ****
Complexe sauf <i>F. culmorum</i> et <i>F. graminearum</i> , sans DII et DIII	<b>R<sup>2</sup>=0,37</b> ****	<b>R<sup>2</sup>=0,16</b> **	<b>R<sup>2</sup>=0,38</b> ****	<b>R<sup>2</sup>=0,57</b> ****	R <sup>2</sup> =0,28 **	<b>R<sup>2</sup>=0,32</b> ***	R <sup>2</sup> =0,72 ***	<b>R<sup>2</sup>=0,34</b> ****
<i>F. poae</i> , sans DII et DIII	R <sup>2</sup> =0,28 ****	R <sup>2</sup> =0,01 ns	R <sup>2</sup> =0,34 ****	R <sup>2</sup> =0,54 ****	<b>R<sup>2</sup>=0,34</b> **	R <sup>2</sup> =0,20 **	<b>R<sup>2</sup>=0,92</b> ***	R <sup>2</sup> =0,20 ****

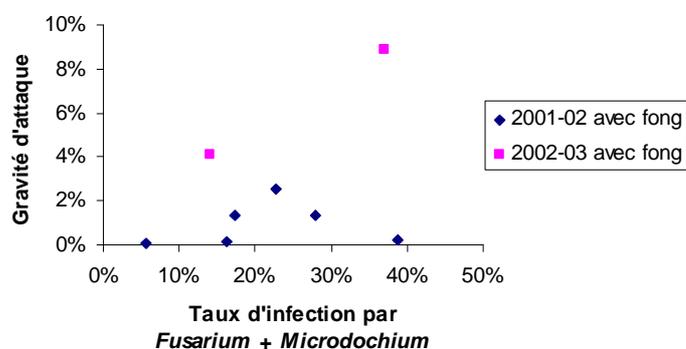
Le modèle correspond au test de l'effet des “champignons responsables” sur les niveaux d'attaque dans chaque regroupement de parcelles. Le tableau présente le coefficient de détermination et le niveau de signification de chaque relation : ns, non significatif ; \*  $\alpha < 0,1$  ; \*\*  $\alpha < 0,05$  ; \*\*\*  $\alpha < 0,01$  ; \*\*\*\*  $\alpha < 0,001$ . En gras les relations les plus significatives. En bleu les meilleures relations obtenues pour chaque type de niveau d'attaque et pour les deux “meilleurs” regroupements de parcelle. <sup>a</sup> Parcelles conduites avec la variété *Charger* (parcelles “contrôles”), ainsi que les parcelles des systèmes intégré et sans travail du sol en 2002-03.

**Figure 6-3-3 : Relation entre les niveaux d'attaque des épis et le taux d'infection des grains en cas de traitements fongicides dans l'essai systèmes**

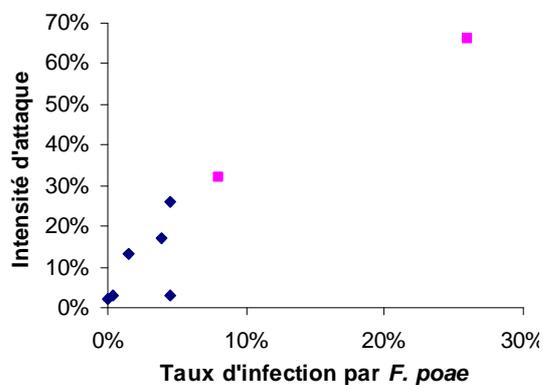
a- Intensité selon l'ensemble du complexe



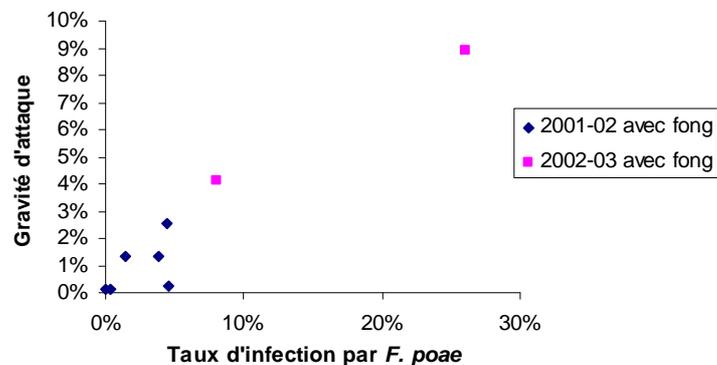
b- Gravité selon l'ensemble du complexe



c- Intensité selon *F. poae*

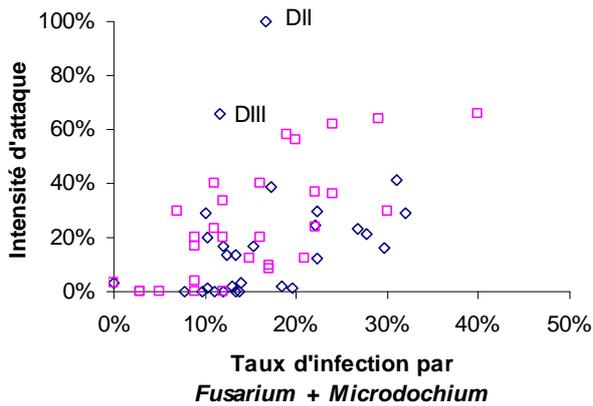


d-Gravité selon *F. poae*

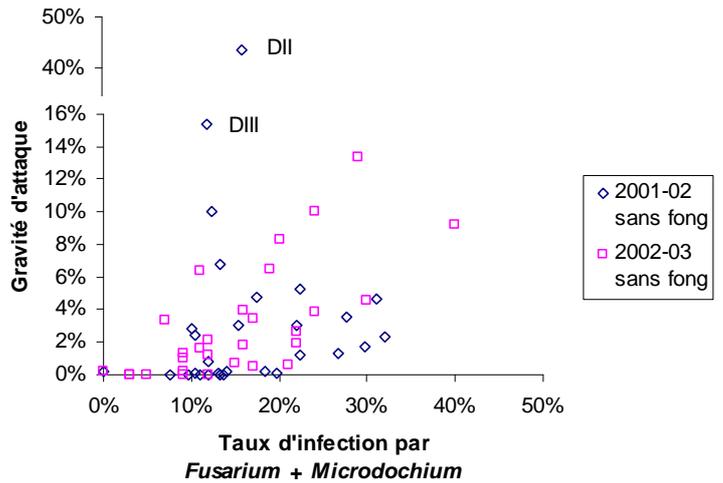


**Figure 6-3-4 : Relation entre les niveaux d'attaque et le taux d'infection des grains en absence de traitement fongicide**

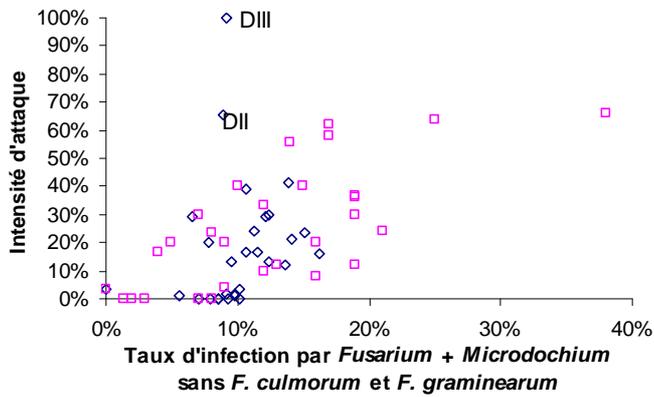
a- Intensité selon l'ensemble du complexe



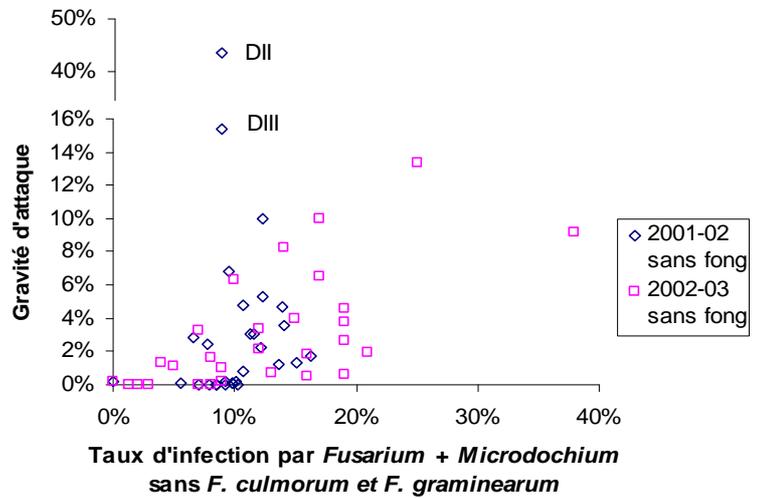
b- Gravité selon l'ensemble du complexe



c- Intensité selon l'ensemble du complexe à l'exception de *F. culmorum* et *F. graminearum*



d- Gravité selon l'ensemble du complexe à l'exception de *F. culmorum* et *F. graminearum*



Sur l'ensemble des parcelles de l'essai et du réseau sans traitement fongicide.

En absence de traitement fongicide sur l'essai, les niveaux d'intensité et de gravité d'attaque sont bien corrélés au degré d'infection par l'ensemble des espèces du complexe fusarien (**Tableau 6-3-1**), comme on le croit généralement. A noter que les relations sont améliorées après l'élimination, pour le calcul des taux d'infection du complexe, des taux issus de *F. graminearum* et *F. culmorum* (**Tableau 6-3-1**). L'observation conjointe de l'ensemble des parcelles non traitées par des fongicides confirme que les niveaux d'intensité et de gravité d'attaque des épis semblent bien influencés par les niveaux d'infection par l'ensemble des champignons du complexe fusarien, et ce d'autant mieux si *F. culmorum* et *F. graminearum* ne sont pas considérés (**Tableau 6-3-1, Figures 6-3-4**).

### 3.3- Discussion

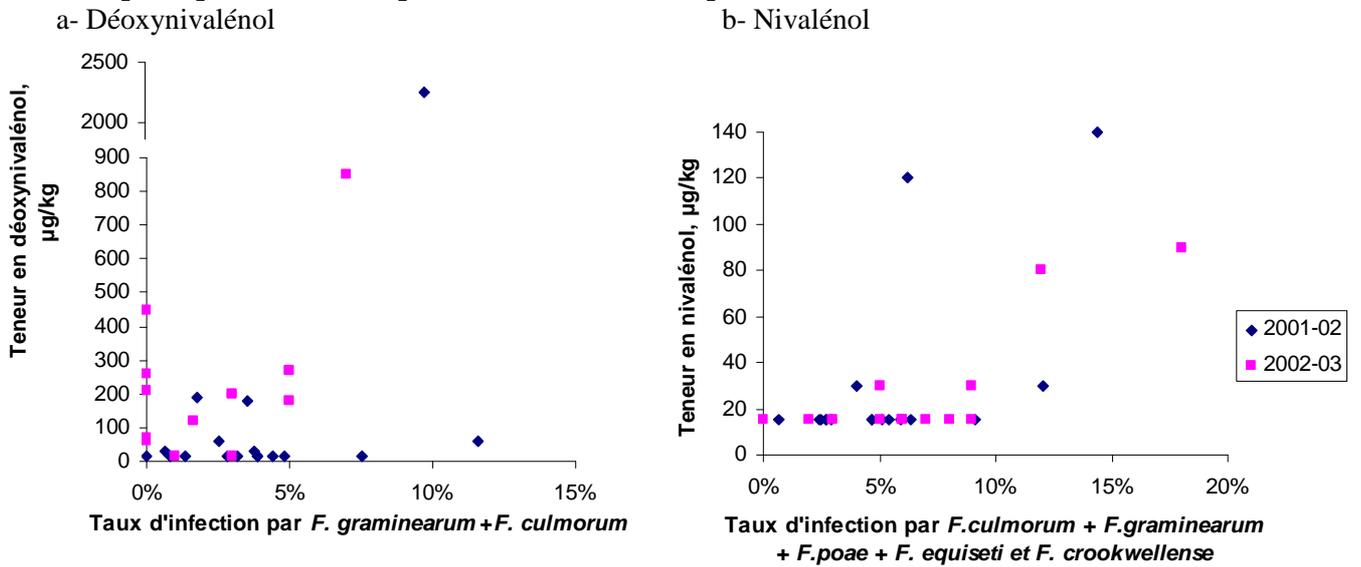
Sur l'ensemble des parcelles, les symptômes de fusariose apparaissent corrélés de façon significative aux taux d'infection des grains par l'ensemble du complexe fusarien. Ceci confirme l'importance pour la maladie du genre *Microdochium* et de l'ensemble des autres *Fusarium*, c'est-à-dire des agents de la fusariose non toxino-gène. Si on ne s'intéresse pas exclusivement aux problèmes de contamination en toxines, la lutte plus globale vis-à-vis de la fusariose ne doit donc pas se limiter à une lutte contre les espèces potentiellement productrices de toxines.

D'autre part, le type de conduite culturale ("cohérente" ou non, c'est-à-dire avec un système de culture conduit de façon cohérente ou avec le même système de culture, mais mené sans fongicide avec la variété *Charger*, réputée sensible) semble intervenir sur la corrélation entre taux d'infection et niveaux d'attaque. Ainsi, pour un même taux d'infection, les niveaux d'attaque dans les systèmes "contrôle" sont souvent plus importants que dans les systèmes conduits de façon "cohérente" et les niveaux d'attaque sont également généralement plus élevés dans les parcelles sans fongicide que dans les parcelles avec fongicide. Dans la mesure où, à la récolte, les niveaux d'infection des différents types d'espèces sont similaires sur les deux types de systèmes, deux hypothèses (qui ne s'excluent pas) peuvent expliquer ce résultat, à savoir : (i) des dates de colonisation différentes, et (ii) des pratiques culturales qui, en intervenant sur l'environnement des champignons et l'adaptation de la culture à son environnement, influent sur l'expression de la maladie.

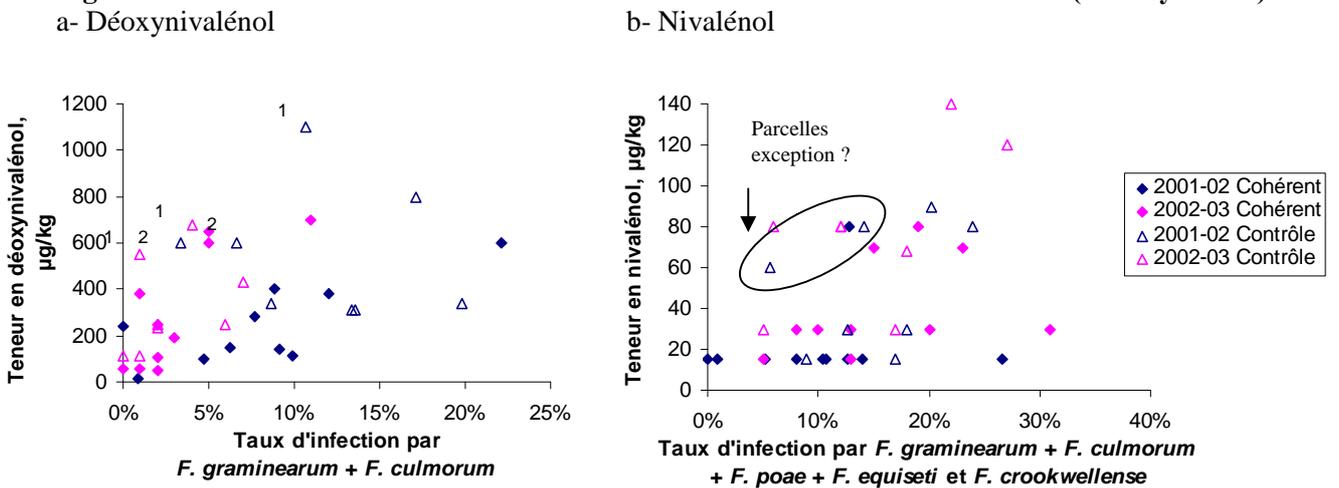
Troisièmement, quel que soit le dispositif et/ou le type de système de culture considéré, les symptômes de fusariose ne semblent pas trop dépendre de l'infection par *F. graminearum* et *F. culmorum*, mais plutôt de celle de *F. poae*, seul ou conjointement aux autres *Fusarium* et aux *Microdochium*. La non-implication de *F. culmorum* et *F. graminearum* dans les niveaux d'attaques pourrait révéler que ces espèces arrivent tardivement sur les parcelles, n'intervenant donc ni dans l'extension ni dans la gravité de la maladie. Même si, à notre connaissance, cela n'a jamais été démontré, cette hypothèse pourrait notamment expliquer les très faibles teneurs en déoxynivalénol observées sur nos parcelles et les contaminations tardives supposées de ces dernières (comme mentionné au chapitre 4), notamment en 2001-02. *A contrario*, la très forte implication de *F. poae* dans les niveaux d'attaque en cas de traitements fongicides au cours de la culture pourrait révéler une absence d'effet sur cette espèce (ou tout du moins un moindre effet) des traitements fongicides employés. Ce serait alors la première espèce présente dans la parcelle et elle pourrait ainsi déterminer, par son taux d'infection, les niveaux des attaques ; et ce d'autant plus qu'elle est l'espèce au taux d'infection le plus variable sur nos parcelles. Des expérimentations spécifiques devraient être mises en place pour tester cette hypothèse.

Pour pouvoir parler d'une éventuelle relation des symptômes observés sur les épis avec quoi que ce soit, il est important de vérifier que ces symptômes ont été bien évalués. Le fait que de faibles attaques des épis ne cachent pas trop de fortes infections des grains confirme que cela a bien été le cas. Une seule parcelle (DVI) présente une intensité d'attaque non nulle (mais faible : 3%) alors qu'aucun isolat du complexe fusarien n'a été détecté dessus : ceci est probablement dû à la précision limitée de l'isolement mycologique ( $\pm 1\%$ ).

**Figure 6-4-1 : Relation entre les niveaux de contamination des grains et leur taux d'infection par les espèces potentiellement productrices de toxines (parcelles du réseau)**



**Figure 6-4-2 : Relation entre les niveaux de contamination et les taux d'infection (essai systèmes)**



1 parcelles du système sans travail du sol,  
2 parcelles du système biologique

Les corrélations entre les différents niveaux d'attaque sur les épis et les proportions de grains infectés ne sont pas très strictes (les coefficients de détermination sont rarement supérieurs à 50%). Plusieurs hypothèses peuvent être émises à ce propos, indépendamment d'une éventuelle mauvaise précision de mesure des variables considérées : (i) les souches d'une espèce donnée présentes sur les différentes parcelles sont différentes et ne présentent pas forcément la même agressivité, (ii) les conditions environnementales peuvent modifier l'agressivité des souches vis-à-vis de la plante et ainsi avoir un impact sur le développement de la maladie ou (iii) la date d'infection en une espèce donnée pourrait différer selon les parcelles et modifier ainsi la compétition entre les espèces, voire leur agressivité.

## 4- Relation entre les espèces présentes sur les grains et la contamination de ceux-ci par les toxines

### 4.1- Effets des systèmes de culture

Les relations entre les contaminations des grains en toxines (déoxynivalénol et nivalénol) et les taux d'infection des grains par les espèces de *Fusarium* potentiellement productrices de ces toxines sont représentées sur les **Figures 6-4-1** et **6-4-2**, respectivement pour les parcelles du réseau et celles de l'essai systèmes. L'ensemble des résultats des analyses statistiques décrites dans cette partie est repris dans le **Tableau 6-4-1**.

Sur l'ensemble des données, les taux d'infection des différentes espèces potentiellement productrices de chaque toxine semblent corrélés positivement aux niveaux de toxines produits, mais en partie seulement (**Tableau 6-4-1**) : parfois, une faible infection des grains suffit à une forte production de toxine : 600 µg/kg de déoxynivalénol peuvent être trouvés sur des parcelles de l'essai systèmes présentant moins de 5% de grains infectés, et 80 µg/kg de nivalénol peuvent être trouvés sur des parcelles présentant moins de 20% de grains infectés ; mais parfois, on peut avoir jusqu'à 26% de grains infectés par ces espèces sans pour autant avoir de contamination détectable en nivalénol (cf aussi **Tableau 6-2-3**). Ces résultats semblent donc indiquer des différences de production de toxines, pouvant sans doute résulter d'une variabilité génétique à l'intérieur d'une espèce, ou encore des effets de l'environnement des champignons (environnement nutritif, climatique, et/ou biologique -par l'intermédiaire des compétitions inter-espèces). Ceci se traduit par le fait que les taux d'infection "expliquent" moins de la moitié des niveaux de contamination. Sur les différents dispositifs, aucune différence entre années n'est observée.

Sur les parcelles du réseau (**Figure 6-4-1a**), la mise en regard (**Tableau 6-2-3**) des contaminations en déoxynivalénol avec les pourcentages d'infection par les espèces potentiellement productrices de cette toxine permet d'identifier trois groupes de parcelles. Certaines parcelles présentent des niveaux non nuls de contamination en déoxynivalénol et d'infection par les deux espèces potentiellement productrices de cette toxine, *F. graminearum* et *F. culmorum*. D'autres, au contraire, ne présentent pas de contamination en déoxynivalénol alors qu'elles présentent des taux d'infection non nuls en espèces potentiellement productrices de cette toxine et enfin, un troisième groupe de parcelles présente des niveaux de contamination non nuls alors qu'aucune souche des deux espèces potentiellement toxigènes n'est détectée.

Les niveaux d'infection par les espèces potentiellement productrices de nivalénol (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. equiseti* et *F. crookwellense*) tendent à augmenter avec les taux de contamination par cette toxine sur le réseau (**Figure 6-4-1b**, **Tableau 6-4-1**). Cette production semble essentiellement liée au taux d'infection par *F. poae*, *F. culmorum* et *F. graminearum* (**Tableau 6-4-1**). Cependant, ce résultat est limité par le fait que la présence de nivalénol n'est quantifiable que sur quatre parcelles seulement.

**Tableau 6-4-1 : Résultats des régressions linéaires entre le taux d'infection des grains par des espèces potentiellement toxigènes et les niveaux effectifs de contamination des grains par les différentes toxines**

Champignons responsables	Toutes données	Réseau	Essai systèmes					Réseau et essai sans fongicides
			Tous	Cohérent	“Contrôle”	Sans fongicide <sup>a</sup>	Avec fongicides	
<b>Déoxynivaléol</b>								
<i>F.culmorum</i> + <i>F.graminearum</i>	R <sup>2</sup> =0,14 ***	R <sup>2</sup> =0,19 **						R <sup>2</sup> =0,16 ***
<i>F.culmorum</i> + <i>F.graminearum</i> sans EI	<b>R<sup>2</sup>=0,16</b> ****	R <sup>2</sup> =0,01 ns	R <sup>2</sup> =0,12 **	R <sup>2</sup> =0,26 **	R <sup>2</sup> =0,09 ns	R <sup>2</sup> =0,14 **	<b>R<sup>2</sup>=0,81</b> ***	<b>R<sup>2</sup>=0,17</b> ***
<i>F.culmorum</i>	R <sup>2</sup> =0,11 ***	R <sup>2</sup> =0,03735 ns	<b>R<sup>2</sup>=0,20</b> ***	<b>R<sup>2</sup>=0,43</b> ***	R <sup>2</sup> =0,14 ns	<b>R<sup>2</sup>=0,21</b> **	R <sup>2</sup> =0,72 ***	R <sup>2</sup> =0,12 ***
<i>F.culmorum</i> sans EI	R <sup>2</sup> =0,16 ****	R <sup>2</sup> =0,05 ns						R <sup>2</sup> =0,16 ***
<b>Nivaléol</b>								
<i>F.culmorum</i> + <i>F.graminearum</i> + <i>F.poa</i> + <i>F.equiseti</i> + <i>F.crookwellense</i>	R <sup>2</sup> =0,26 ****	R <sup>2</sup> =0,41 ****	R <sup>2</sup> =0,17 ***	R <sup>2</sup> =0,17 *	R <sup>2</sup> =0,21 *	R <sup>2</sup> =0,34 ***	R <sup>2</sup> =0,02 ns	R <sup>2</sup> =0,42 ****
<i>F.culmorum</i> + <i>F.poa</i>	<b>R<sup>2</sup>=0,32</b> ****	R <sup>2</sup> =0,22 ***	<b>R<sup>2</sup>=0,33</b> ****	<b>R<sup>2</sup>=0,36</b> ***	<b>R<sup>2</sup>=0,42</b> ***	<b>R<sup>2</sup>=0,38</b> ****	R <sup>2</sup> =0,11 ns	R <sup>2</sup> =0,38 ****
<i>F.culmorum</i> + <i>F.graminearum</i> + <i>F.poa</i>	R <sup>2</sup> =0,28 ****	<b>R<sup>2</sup>=0,42</b> ****	R <sup>2</sup> =0,20 ***	R <sup>2</sup> =0,21 **	R <sup>2</sup> =0,24 **	R <sup>2</sup> =0,36 ****	R <sup>2</sup> =0,02 ns	<b>R<sup>2</sup>=0,43</b> ****

Le modèle correspond au test de l'effet des “champignons responsables” sur les niveaux de contamination dans chaque regroupement de parcelles. Le tableau présente le coefficient de détermination et le niveau de signification de chaque relation : ns, non significatif ; \*  $\alpha < 0,1$  ; \*\*  $\alpha < 0,05$  ; \*\*\*  $\alpha < 0,01$  ; \*\*\*\*  $\alpha < 0,001$ . En gras les relations les plus significatives. En bleu les meilleures relations obtenues pour chaque type de niveau d'attaque et pour les deux “meilleurs” regroupements de parcelle.

<sup>a</sup> Parcelles conduites avec la variété *Charger* (parcelles “contrôles”), ainsi que les parcelles des systèmes intégré et sans travail du sol en 2002-03.

Sur l'essai systèmes, la corrélation d'ensemble entre les niveaux de déoxynivalénol dosés et les taux d'infection par les espèces potentiellement productrices est encore moins claire (**Figure 6-4-2a, Tableau 6-4-1**, à l'exception peut-être d'une corrélation avec *F. culmorum* seul. Là encore, trois parcelles présentent des niveaux de contamination non nuls sans que des souches potentiellement productrices n'aient été identifiées.

Comme sur le réseau, la production de nivalénol sur l'essai systèmes est fonction du taux d'infection par les espèces potentiellement productrices de cette toxine, à savoir *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. equiseti* et *F. crookwellense* (**Tableau 6-4-1, Figure 6-4-2b**). Cette production semble essentiellement liée au taux d'infection par *F. poae* et *F. culmorum*. A l'observation de la figure, il semble qu'à l'exception de ce qui se passe sur 4-5 parcelles, un seuil d'infection par les espèces potentiellement productrices d'environ 15% des grains soit nécessaire à la production de nivalénol.

Quand on distingue les différents types de conduites des systèmes de culture dans l'essai, la production de déoxynivalénol apparaît de nouveau faiblement liée au taux d'infection des grains par *F. culmorum* et *F. graminearum* (**Tableau 6-4-1**). La prise en compte du taux d'infection par *F. culmorum* seul permet parfois l'obtention d'une meilleure relation (conduite cohérente et sans fongicide). En conduite "contrôle", aucun effet du taux d'infection par les espèces potentiellement productrices de déoxynivalénol sur la contamination par cette toxine n'est mis en évidence (**Tableau 6-4-1**). Ce résultat surprenant semble essentiellement résulter de la très forte contamination, par rapport à leur taux d'infection, des parcelles des systèmes biologique et sans travail du sol avec couverture permanente dans le bloc II en 2001-02, ainsi que du système sans travail du sol avec couverture permanente en 2002-03 (**Figure 6-4-2a**). Ces parcelles présentent souvent une forte infection par *F. culmorum*.

La production de nivalénol n'apparaît pas liée aux taux d'infection des grains par des espèces potentiellement productrices de cette toxine (en systèmes de culture cohérents), ou alors très faiblement (en conduite "contrôle") (**Tableau 6-4-1, Figure 6-4-2b**). Cependant, la prise en compte de *F. culmorum* et *F. poae* seulement permet l'obtention de relations significatives dans les deux types de conduites (**Tableau 6-4-1**).

Quand certaines espèces potentiellement productrices ne paraissent pas intervenir dans la production de mycotoxines, deux hypothèses peuvent être envisagées : soit les souches présentes de ces espèces ne sont génétiquement pas capables de produire la toxine (même si l'espèce l'est), soit l'environnement, tant nutritif, que climatique ou biologique (compétition ou synergie inter-espèces), n'a pas favorisé ou permis la production de toxines par ces souches.

#### **4.2- Effets des traitements fongicides**

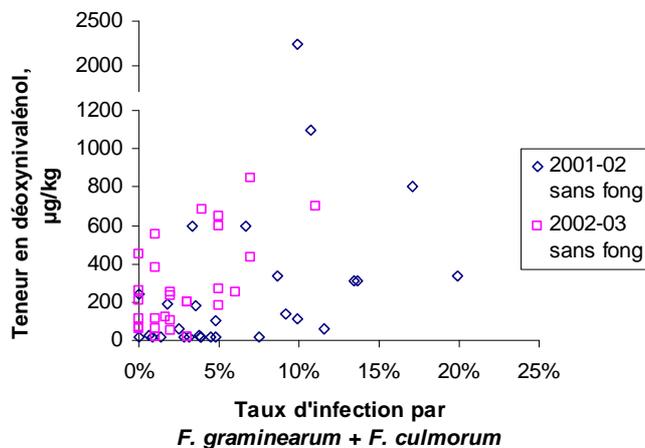
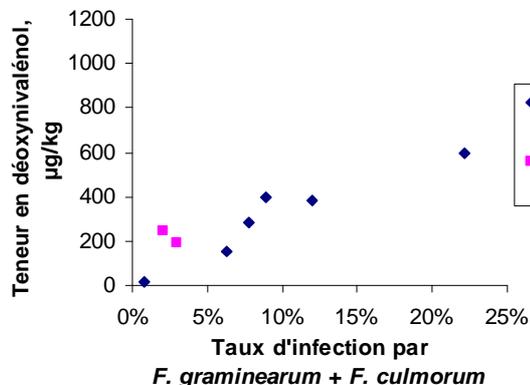
En cas de traitements fongicides sur l'essai, le taux d'infection par les espèces potentiellement productrices de déoxynivalénol augmente avec la production de déoxynivalénol (**Figure 6-4-3a, Tableau 6-4-1**). Pour le nivalénol, une seule parcelle présente un niveau de nivalénol quantifiable après traitement fongicide, ce qui ne permet pas de dégager de relation pour cette toxine.

Si, comme pour la maladie, nous considérons l'ensemble des parcelles non traitées, on constate alors que les espèces potentiellement productrices de déoxynivalénol sont faiblement liées à la contamination par cette toxine (**Figure 6-4-3b, Tableau 6-4-1**). L'ensemble des espèces potentiellement productrices de nivalénol et plus spécifiquement *F. poae*, *F. culmorum* et *F. graminearum* semblent influencer la contamination par cette toxine (**Figure 6-4-4, Tableau 6-4-1**).

**Figure 6-4-3 : Relation entre les niveaux de déoxynivalénol et les taux d'infection par *F. graminearum* et *F. culmorum***

a- En cas de traitements fongicides (essai seul)

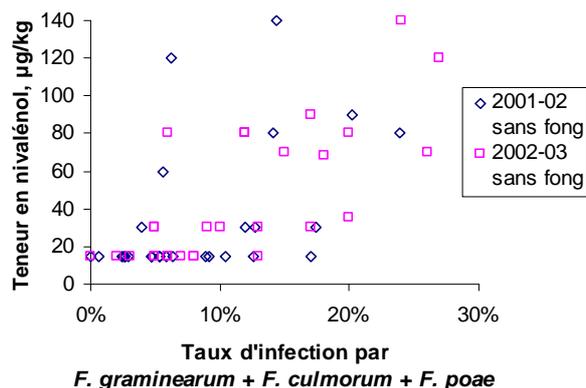
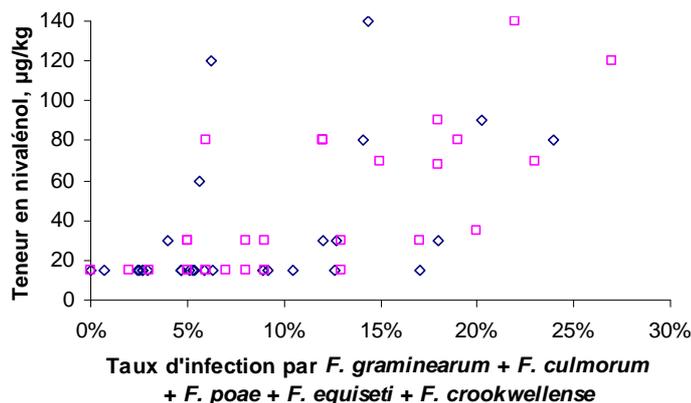
b- En cas d'absence de traitement fongicide (essai + réseau)



**Figure 6-4-4 : Relation entre les niveaux de nivalénol et les taux d'infection par les espèces potentiellement productrices, en absence de traitement fongicide**

a- Selon l'ensemble des espèces potentiellement productrices

b- Selon trois des espèces potentiellement productrices



Sur les parcelles de l'essai et celles du réseau

**Tableau 6-5-1 : Variabilité d'un épi à l'autre (voisin) du potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. culmorum* et *F. graminearum***

Variété	Epi	Taux d'infection par				
		<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		
		Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel indéterminé
Apache	1		6%		11%	
	2	8%	8%	8%	8%	
	3	16%			4%	
	5				8%	
	6				5%	
	10					4%
Charger	2				4%	
	3			5%		
	5				31%	
	7				6%	
	8				3%	3%

Les épis présentés ici sont ceux du **Tableau 6-2-1** portant les deux espèces étudiées.

#### 4.3- Discussion

Sur l'ensemble des parcelles, les niveaux de contamination en mycotoxines sont faiblement liés aux taux d'infection par les espèces potentiellement productrices des différentes toxines. Nous avons pu noter que les espèces *F. equiseti* et *F. crookwellense* ne semblent cependant pas jouer un grand rôle dans la production de nivalénol. Deux hypothèses peuvent être émises : un environnement défavorable à la production de toxines pour ces souches, ou une incapacité génétique des souches présentes sur nos parcelles à produire des toxines. Cette dernière hypothèse sera évaluée dans la partie 6 de ce chapitre.

D'autre part, il semblerait que les systèmes de culture, et notamment le choix de la variété combiné à l'application ou non de traitements fongicides, influencent la production de toxines (en modifiant soit la date d'infection des grains, soit l'environnement des champignons et l'adaptation de la culture à son environnement).

Un autre point à considérer concerne le fait que les niveaux de contamination en déoxynivalénol et nivalénol semblent tous deux assez bien corrélés aux taux d'infection par *F. culmorum*. Ceci laisse supposer que (i) les souches de cette espèce sont particulièrement productrices, ou bien que (ii) leur environnement (climatique, nutritif et de compétition ou synergie inter-espèces) stimule fortement leur production de toxines, ou encore que (iii) des souches des deux chémotypes déoxynivalénol et nivalénol existent en proportion similaire. La dernière hypothèse est testée dans la partie 5 de ce chapitre ; pour tester les deux premières hypothèses, il serait intéressant de faire des identifications mycologiques en cours de remplissage des grains (pour tenter de déterminer, notamment, les dates d'infection et l'ordre d'apparition des différentes espèces), ainsi qu'un suivi climatique et nutritif de l'environnement immédiat des champignons.

Par ailleurs, nos résultats confirment que les grains peuvent être infectés par les espèces potentiellement toxigènes sans qu'aucune contamination ne soit révélée. A l'inverse, de très faibles infections ont été associées à de forts niveaux de contamination (au moins dans la gamme que nous avons observée). Ces situations résultent, nous l'avons dit, d'une capacité génétique variable des souches à produire des toxines et/ou de l'environnement des champignons (nutritif, climatique et compétitions interespèces). L'absence d'infection en présence d'une contamination pose cependant la question de la précision des analyses mycologiques. Pour éclairer ce point, nous avons fait refaire des analyses mycologiques sur un plus grand nombre de grains, mais cela n'a rien changé aux résultats. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables, même si elles sont peu vraisemblables : erreur d'échantillonnage lors de l'analyse toxicologique, mort du champignon sur le grain avant la récolte et après la production de toxines, ou encore existence d'autres espèces de champignons capables de produire du déoxynivalénol. Une analyse moléculaire de l'ensemble de la flore des champignons pourrait nous renseigner sur ce dernier aspect.

### 5- Effet du potentiel génétique des souches pour la production de toxines

On a déjà mentionné que l'une des hypothèses pouvant expliquer les faibles coefficients de détermination de nos relations est la présence de souches de pathogènes de potentiels génétiques différents au sein d'une même espèce. Cette hypothèse a été testée grâce au test "*tri5-tri6*".

#### 5.1- Variabilité intraparcellaire des profils de souches

##### *A l'échelle des épis*

L'analyse génétique de souches de *F. culmorum* et *F. graminearum* isolées sur un épi donné, et *a fortiori* sur des épis voisins (**Tableau 6-5-1**), montre que non seulement les deux espèces *F. graminearum* et *F. culmorum* peuvent être présentes sur un même épi, mais également que chaque

**Tableau 6-5-2 : Variabilité d'un endroit à un autre dans la parcelle du potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. culmorum* et *F. graminearum***

Prélèvements dans la parcelle EI	Teneur en déoxynivalénol, µg/kg	Taux d'infection par				
		<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		
		Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel indéterminé
1	2700	1%		1%	9%	1%
2	1800	1%	1%	2%	8%	
3	2133		1%	1%	3%	2%
4	2367	2%	1%	2%	10%	
5	1567		1%	2%	7%	
6	1667		1%	1%	5%	1%

En bleu, les valeurs les plus fortes d'une colonne.

**Tableau 6-5-3 : Potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. culmorum* et *F. graminearum* présentes sur les parcelles du réseau, et contamination en toxines des grains issus de ces parcelles**

Années	Parcelles	Teneur en déoxynivalénol, µg/kg	Teneur en nivalénol, µg/kg	Taux d'infection par				
				<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		
				Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel indéterminé
2001-02	AI	180	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	4%	0%
	AII	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	1%	1%	1%	0%	0%
	AIII	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	1%	0%
	BI	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>	0%	0%	0%	2%	0%
	BIII	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	3%	0%
	BIV	60	140	1%	0%	1%	10%	0%
	CI	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	1%	2%	2%
	CII	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	1%	1%	0%	3%	0%
	CIII	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	1%	0%
	CIV	<d <sub>l</sub>	120	0%	0%	0%	4%	0%
	DI	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	1%	0%
	DII	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	1%	1%	0%	6%	0%
	DIII	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	3%	0%
	DIV	60	<d <sub>l</sub>	0%	0%	1%	1%	0%
	EI *	2250	<q <sub>l</sub>	1%	1%	1%	7%	1%
EII	190	<d <sub>l</sub>	0%	0%	1%	0%	1%	
2002-03	AIV	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	3%	0%
	BV	120	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	2%	0%
	BVI	200	<q <sub>l</sub>	0%	0%	0%	3%	0%
	CV	200	90	0%	0%	0%	2%	0%
	DV	180	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	5%	0%
	EIII	270	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	5%	0%
	EIV	850	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	7%	0%
	EVI	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>	0%	0%	0%	2%	0%

\* moyenne des prélèvements 3 et 4 du **Tableau 6-5-2**

Seules les parcelles présentant au moins une souche de *F. graminearum* et/ou *F. culmorum* sont présentées ici. Les différences de taux d'infection entre ce tableau et le **Tableau 6-2-3** sont dues aux erreurs d'arrondis. En bleu, les valeurs les plus fortes d'une colonne, par année.

espèce peut être représentée par plusieurs souches différentes, avec des potentiels toxigènes différents. La diversité du complexe de champignons responsable de la fusariose de l'épi et de la contamination par les mycotoxines fusariennes est donc très grande, même à l'échelle de l'épi.

#### ***A l'échelle d'une parcelle***

Sur la parcelle EI, des souches de différents potentiels toxigènes apparaissent dans une zone donnée d'une parcelle, tandis qu'elles sont absentes ailleurs (**Tableau 6-5-2**). Les souches de *F. graminearum* à fort potentiel toxigène semblent plus présentes que les autres (la différence entre la proportion des deux chémotypes est telle qu'elle ne semble pas pouvoir s'expliquer uniquement par une simple surestimation des chémotypes "fort potentiel"), tandis que, pour l'espèce de *F. culmorum*, les deux chémotypes semblent présents à des niveaux comparables au sein des différents prélèvements réalisés dans la parcelle.

Aucune relation ne semble lier les prélèvements les plus contaminés en toxines aux prélèvements présentant les plus forts taux d'infection par des souches à fort potentiel toxigène : nous n'arrivons donc pas non plus à expliquer les très forts niveaux de contamination au sein de cette parcelle sur la base de cette variable. Il semble donc de nouveau que l'environnement direct du champignon (climatique, nutritif) ou la résistance de la variété (certaines variétés tolèrent de très forts niveaux de contamination par déoxynivalénol, alors que d'autres dégradent cette toxine, cf **Chapitre 1**) et/ou la compétition avec l'ensemble de la flore des grains, soient à l'origine de ces niveaux élevés.

### **5.2- Relation entre contamination des grains en toxines et chémotype des souches présentes sur les grains**

Cinq espèces sont potentiellement capables de produire les mycotoxines que nous avons trouvées sur nos parcelles : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. equiseti* et *F. crookwellense* (Bottalico, 1998). Les analyses réalisées pour détecter la présence du gène *tri5*, gène intervenant dans la voie de biosynthèse des trichothécènes, ont montré que les souches de *F. equiseti* présentes sur nos parcelles ne possédaient pas ce gène et étaient donc incapables de produire du nivalénol. Ceci explique que la prise en compte des isolats de cette espèce dans les relations précédentes entre les taux d'infection par les espèces potentiellement toxigènes et la production de nivalénol ne soit pas nécessaire. Pour ce qui est de *F. crookwellense*, seules deux souches de cette espèce ont été isolées sur nos parcelles (toutes deux sur l'essai systèmes, en système conventionnel).

Les potentiels génétiques de production de toxines des souches de *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. crookwellense*, évalués d'après un séquençage de leur zone intergénique *tri5-tri6*, sont présentés dans le **Tableau 6-5-3** pour les parcelles du réseau et dans le **Tableau 6-5-4** pour celles de l'essai systèmes. Quatre observations peuvent être faites sur l'ensemble des parcelles.

La première concerne la proportion des deux types de souche -fort ou faible potentiel de production de toxines. Chez *F. culmorum*, on trouve autant de souches à fort potentiel que de souches à faible potentiel. Chez *F. graminearum*, on trouve beaucoup plus de souches à fort potentiel que de souches à faible potentiel (là encore, la différence entre la proportion des deux chémotypes est telle qu'elle ne semble pas pouvoir s'expliquer uniquement par une simple surestimation des chémotypes "fort potentiel"). Cette première observation confirme les observations faites sur les différents prélèvements de la parcelle EI (**Tableau 6-5-2**), et permet à elle seule de comprendre la forte implication de l'espèce *F. culmorum* aussi bien dans la production de déoxynivalénol que dans la production de nivalénol, puisque les deux types de souches sont bien représentés ; tandis que les infections de *F. graminearum* influencent essentiellement la production de déoxynivalénol, puisque le chémotype "fort potentiel de

**Tableau 6-5-4 : Potentiel génétique de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*) des souches de *F. crookwellense*, *F. culmorum* et *F. graminearum* présentes sur les parcelles de l'essai systèmes, et contamination en toxines des grains issus de ces parcelles**  
a- En 2001-02

Système de culture	Bloc	Teneur en déoxynivalénol µg/kg	Teneur en nivalénol, µg/kg	Taux d'infection par						
				<i>F. crookwellense</i>		<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		
				Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel indéterminé
<b>2001-02 Systèmes cohérents</b>										
Conventionnel	I	150	<dl	0%	0%	0%	0%	0%	6%	0%
	II	380	<dl	0%	1%	1%	1%	1%	9%	1%
Intégré	I	<dl	<dl	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
	II	280	<dl	0%	0%	0%	1%	0%	6%	1%
Sans travail du sol	I	400	80	0%	0%	1%	1%	0%	6%	1%
	II	600	<dl	0%	0%	0%	3%	0%	18%	1%
Biologique	I	100	<dl	0%	0%	1%	1%	1%	3%	0%
	II	110	<dl	0%	0%	2%	0%	1%	6%	1%
<b>2001-02 Autre variété cohérente : Renan (variété des agriculteurs)</b>										
Biologique	I	140	<dl	0%	0%	1%	0%	0%	7%	1%
	II	240	<dl	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
<b>2001-02 Systèmes "contrôle"</b>										
Conventionnel	I	310	<ql	1%	0%	0%	2%	2%	9%	0%
	II	340	<ql	0%	0%	1%	1%	0%	7%	0%
Intégré	I	310	<dl	0%	0%	1%	2%	1%	9%	1%
	II	340	80	0%	0%	3%	1%	2%	14%	1%
Sans travail du sol	I	800	90	0%	0%	1%	3%	2%	11%	0%
	II	1100	80	0%	0%	1%	1%	2%	6%	1%
Biologique	I	600	<dl	0%	0%	1%	0%	1%	4%	1%
	II	600	60	0%	0%	0%	1%	0%	2%	0%

b- En 2002-03

Système de culture	Bloc	Déoxynivalénol µg/kg	Nivalénol, µg/kg	Taux d'infection par				
				<i>F. culmorum</i>		<i>F. graminearum</i>		
				Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel faible	Potentiel fort	Potentiel indéterminé
<b>2002-03 Systèmes cohérents</b>								
Conventionnel	I	190	<ql	0%	0%	0%	2%	0%
	II	250	<ql	0%	0%	0%	2%	0%
Intégré	I	650	80	1%	0%	0%	4%	0%
	II	380	70	0%	0%	0%	1%	0%
Sans travail du sol	I	600	<ql	2%	0%	0%	3%	0%
	II	700	70	1%	2%	0%	8%	0%
Biologique	I	<ql	<ql	0%	0%	0%	2%	0%
	II	110	<ql	0%	0%	0%	2%	0%
<b>2002-03 Autre variété cohérente : Renan (variété des agriculteurs)</b>								
Biologique	I	60	<dl	0%	0%	0%	0%	0%
	II	<ql	<dl	0%	0%	0%	1%	0%
<b>2002-03 Systèmes "contrôle"</b>								
Conventionnel	I	250	120	0%	0%	0%	2%	0%
	II	250	<ql	0%	0%	0%	6%	0%
Intégré	I	430	80	0%	0%	0%	6%	1%
	II	230	80	0%	0%	1%	1%	0%
Sans travail du sol	I	550	80	0%	0%	0%	1%	0%
	II	680	140	2%	0%	0%	2%	0%
Biologique	I	110	<ql	0%	0%	0%	0%	0%
	II	110	70	0%	0%	0%	1%	0%

En bleu, les valeurs les plus fortes d'une colonne, par conduite culturale des systèmes de culture.

production de déoxynivalénol” est quasiment le seul présent (partie 4 de ce chapitre).

Deuxièmement, nous constatons, dans l'espèce *F. graminearum*, la présence d'une classe de souches de potentiel de production de toxines “indéterminé” (d'après le test *tri5-tri6*). Ces souches de potentiel indéterminé ont fait l'objet d'une étude particulière pour vérifier si (i) elles correspondaient bien à l'espèce identifiée morphologiquement et si (ii) elles étaient bien potentiellement capables de produire des trichothécènes : l'amplification par PCR de leur gène EF1alpha a d'abord confirmé qu'elles appartenaient bien à l'espèce *F. graminearum* ; une réponse positive au test de détection du seul gène *tri5* a permis de conclure que ces souches étaient bien potentiellement capables de produire des trichothécènes. Nous pouvons donc envisager de façon sérieuse l'existence d'un troisième profil de potentialité toxigène de souches dans cette espèce : des souches capables de produire des trichothécènes (au niveau du gène *tri5* et à condition que celui-ci soit exprimé) mais ne répondant pas positivement à l'identification des séquences qui devraient être mises en évidence lors du test de la zone intergénique des gènes *tri5* et *tri6*. Ces caractéristiques ayant déjà été mises en évidence sur la souche INRA 91/M01.32 (**Tableau 6-1-4**), qui produit (*in grano*) autant de déoxynivalénol que de nivalénol (et non pas une toxine plus que l'autre), on peut supposer que les souches de “potentiel de production indéterminé” observées sur nos parcelles sont des souches ne produisant pas préférentiellement une toxine particulière. Des analyses moléculaires de séquençage de la zone intergénique *tri5-tri6* et des dosages effectifs de toxines devront confirmer l'existence de ce troisième groupe de souches.

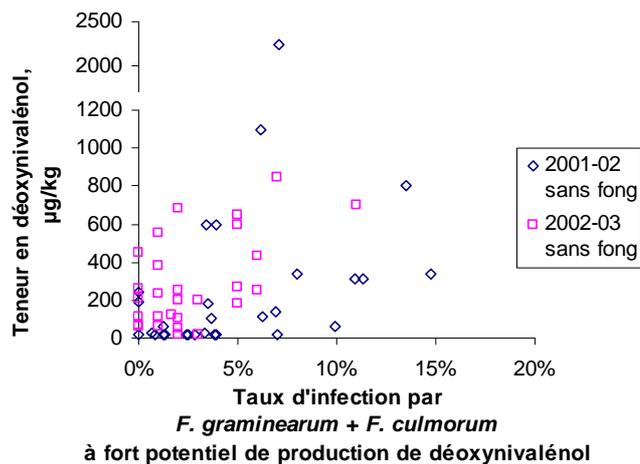
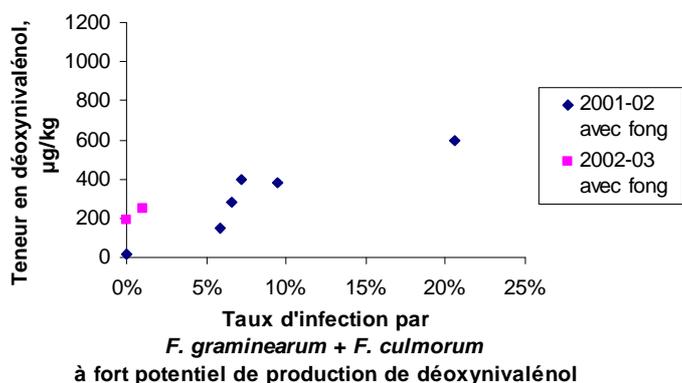
Le troisième point concerne les corrélations précédemment évoquées entre espèces infectantes et toxines produites. On peut noter que le taux d'infection par les *F. culmorum* et *F. graminearum* à forte potentialité de production de déoxynivalénol est significativement lié à la production de déoxynivalénol aussi bien en conduite avec fongicides qu'en conduite sans fongicide (**Figure 6-5-1**). En absence de fongicide, le taux d'infection par *F. poae* ainsi que par les *F. culmorum* et *F. graminearum* à faible potentialité de production de déoxynivalénol est significativement lié à la production de nivalénol (**Figure 6-5-2**). Cette figure montre un important effet de l'année : les mêmes niveaux de contamination par nivalénol résultent de taux d'infection plus élevés en 2002-03 qu'en 2001-02. Néanmoins, la prise en compte de cette caractéristique ne permet pas d'améliorer les résultats obtenus précédemment sur les effets de l'infection par les espèces potentiellement productrices de toxines (partie 4 de ce chapitre). De plus, la présence de souches à fort potentiel de production de déoxynivalénol ne déclenche pas systématiquement une production de toxine importante. Ces différents éléments soulignent sans doute de nouveau l'importance de l'environnement de la souche dans la production de mycotoxines, ce qui implique que la seule caractérisation génétique des souches présentes ne peut pas rendre compte de la variabilité des niveaux de contamination.

Enfin, les proportions relatives des différents types de potentiel génétique restent stables d'une année sur l'autre (**Tableaux 6-5-3 et 6-5-4**). Le taux d'infection par *F. poae* augmentant en 2002-03 par rapport à l'ensemble des *Fusarium*, le taux d'infection par des souches à forts potentiels de production de déoxynivalénol est donc plus faible en 2002-03 qu'en 2001-02. Dans la mesure où, comme nous l'avons observé précédemment, les grains de l'année 2002-03 se trouvent être plus contaminés par déoxynivalénol et nivalénol que ceux de l'année 2001-02, notamment sur les parcelles agricoles, l'hypothèse d'une stimulation de la production de déoxynivalénol par la présence de *Fusarium* non potentiellement producteur de cette toxine semble se dégager.

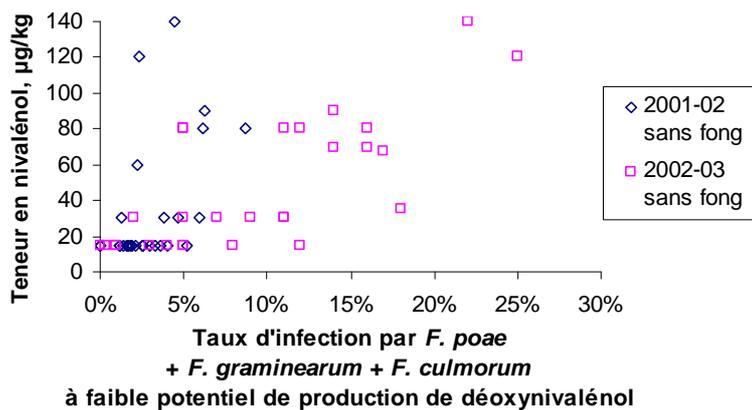
**Figure 6-5-1 : Relation entre les taux de déoxynivalénol et les taux d'infection par *F. culmorum* et *F. graminearum* à forte potentialité de production de toxines (d'après le test *tri5- tri6*)**

a- Parcelles avec fongicide  
(essai seul,  $R^2=0,81$ ,  $\alpha < 0,01$ )

b- Parcelles sans fongicide  
(essai + réseau,  $R^2=0,14$ ,  $\alpha < 0,01$  sans EI)



**Figure 6-5-2 : Relation entre les taux de nivalénol et les taux d'infection par *F. poae* ainsi que *F. culmorum* et *F. graminearum* à forte potentialité de production de nivalénol**



Sur les parcelles de l'essai et celles du réseau ( $R^2=0,33$ ,  $\alpha < 0,001$ )

## 6- Discussion - Conclusion

Notre étude illustre la diversité des profils d'espèces que l'on peut trouver sous contamination naturelle dans une même région. Ces profils sont fonction de l'année, des pratiques culturales et du système de culture. Les choix de la variété, du travail du sol et du type de sol semblent également avoir une influence, mais cela reste à vérifier sur d'autres parcelles, et notamment dans des gammes d'infection, d'attaque et de contamination plus larges. **Les traitements fongicides, en revanche, ne semblent pas affecter la proportion des différentes espèces au sein du complexe** (ces résultats sont similaires à ceux de Chandelier *et al.*, 2003) **mais semblent cependant réduire le taux d'infection des grains**. Le système biologique paraît moins infecté que les autres systèmes.

Les parcelles que nous avons suivies se caractérisent, nous l'avons vu, par des niveaux d'attaque et de contamination généralement assez faibles. Ces faibles niveaux sont en rapport avec de relativement faibles taux d'infection des grains : **la faiblesse des attaques sur les enveloppes ne cachait pas d'importantes infections sur les grains**. Cependant, les parcelles agricoles DII et DIII (qui présentent de forts taux d'attaque) et la parcelle EI (qui présente un fort taux de contamination) ne présentent pas non plus des niveaux d'infection très forts. Trois hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat : des isolats infectants mais morts avant la récolte ; ou bien des erreurs de notation dans les parcelles DII et DIII (confusion de symptômes type cernes noirs avec ceux de saprophytes, ou plus vraisemblablement confusion de symptômes type épi blanchâtre avec ceux d'un échaudage précoce) ; ou encore des souches plus productives en déoxynivalénol sur la parcelle EI qu'ailleurs.

La faiblesse des niveaux d'infection, d'attaque et de contamination ne facilite pas la corrélation de ces différents paramètres entre eux. En cas de faible proportion de grains infectés, il est possible qu'aucun symptôme ne soit visible (du moins selon notre méthode de mesure qui ne tient pas compte des symptômes couvrant moins d'un tiers de la surface des épillets), ou encore que les toxines produites soient en dessous du seuil de détection. Pourtant, de relativement fortes contaminations en déoxynivalénol ou nivalénol ont parfois été obtenues. Nos observations confirment que **l'absence de relations évidentes, sous contamination naturelle, entre symptômes et production de toxines**, déjà observée avant nous un certain nombre d'auteurs (Fourbet *et al.*, 2001; Birzele *et al.*, 2002 ; Magan *et al.*, 2002), est **en partie due à la possibilité d'avoir des infections par des champignons non toxigènes comme les *Microdochium* (fortes attaques de maladie malgré de faibles contaminations), ou inversement des infections par des espèces de *Fusarium* toxigènes comme *F. culmorum* et *F. graminearum* (fortes contaminations malgré de faibles symptômes).**

Néanmoins, malgré l'étroitesse des gammes de variation observées, et la précision relative des mesures, des tendances semblent se dégager, reliant les niveaux d'infection par les différentes espèces et les niveaux d'attaques ou de contamination par les mycotoxines. Ainsi, il ressort de l'étude que les attaques notées sur la surface des épis (en terme d'intensité ou de gravité de la maladie) sont relativement bien corrélées à la proportion de grains attaqués par les deux genres de champignons du complexe fusarien (*Fusarium* et *Microdochium*). L'implication de *Microdochium* dans le déterminisme de la gravité et de l'intensité des attaques est très importante (et confirme le caractère pathogène pour la plante de cette espèce pourtant non productrice de toxines). Les relations ne sont cependant pas très strictes. Des différences dans la migration entre les enveloppes et les grains (c'est-à-dire entre les organes sur lesquels on note les symptômes et ceux sur lesquels on isole les champignons), dans l'agressivité des isolats (Chandelier *et al.*, 2003), dans la compétition ou la synergie entre microorganismes (Sutton, 1982 ; Galtier *et al.*, 2000 ; Blaney and Dodman, 2002 ; Magan *et al.*, 2002), dans les environnements, climatique (Sutton, 1982 ; Chelkowski *et al.*, 2000 ; Blaney and Dodman, 2002 ; Hooker *et al.*, 2002 ; Magan *et al.*, 2002) ou nutritif (Marin *et al.*, 1999) du champignon, peuvent intervenir pour expliquer une certaine "lâcheté" des relations, au même titre

que l'interaction entre la pathogénicité d'une souche et les différentes variétés de blé (Mesterhazy, 1983 ; ShouXi and Kleijer, 2001) ou la plus ou moins grande précocité des attaques (Sutton, 1982 ; Galtier *et al.*, 2000 ; Blaney and Dodman, 2002 ; Magan *et al.*, 2002).

La prise en considération des effets des systèmes de culture permet d'affiner les tendances obtenues. Ainsi, **les niveaux d'attaques seraient essentiellement dépendants du taux d'infection par *F. poae* lors de traitements fongicides au cours de la culture, et de l'ensemble du complexe fusarien à l'exception de *F. graminearum* et *F. culmorum* en cas d'absence de traitements fongicides.** De ce constat, trois hypothèses peuvent être tirées.

La première concerne les fongicides et l'implication de *F. poae*. Chaque espèce du complexe ayant une sensibilité spécifique à une famille donnée de fongicides (Caron, 2000 ; Maumené *et al.*, 2000a ; Maumené *et al.*, 2000b ; Carlier, 2001 ; Ioos and Faure, 2001 ; Maumené *et al.*, 2001 ; Young, 2001), l'efficacité des produits phytosanitaires actuels dépend de la composition du complexe parasitaire présent sur la parcelle (Parry *et al.*, 1995). Dans la mesure où l'infection par *F. poae* semble corrélée avec les toxines produites en présence et en absence de traitement fongicide, et où la proportion d'isolats de *F. poae* dans le complexe fusarien est similaire à la récolte en absence ou en présence de fongicide (respectivement 39% et 35% en moyenne sur les deux années, résultats similaires à ceux de Chandelier *et al.*, 2003), nous pouvons supposer que **l'efficacité des traitements fongicides est assez faible sur *F. poae*, retardant davantage les autres espèces du complexe fusarien.** Cette hypothèse pourrait sans doute facilement être testée expérimentalement.

La seconde hypothèse concerne aussi l'efficacité des fongicides, mais sur les espèces du complexe fusarien qui ne sont ni *F. poae* (dont nous avons parlé), ni *F. culmorum* ou *F. graminearum* (dont nous parlerons ensuite). Les espèces concernées, notamment les *Microdochium* et les autres *Fusarium*, **semblent intervenir dans la détermination des niveaux d'attaques en absence de traitements fongicides**, mais pas en présence de traitements fongicides. Ceci permet de supposer que les fongicides sont bien efficaces sur ces espèces. Néanmoins, la proportion de ces espèces dans le complexe fusarien étant moins importante à la récolte en absence (21%) qu'en présence de fongicide (31%), on peut supposer que **l'effet mis en évidence résulte essentiellement d'une date de colonisation plus précoce en absence de fongicide** qu'en leur présence (l'efficacité des fongicides serait alors caractérisée par une inhibition de l'implantation des champignons en début de remplissage).

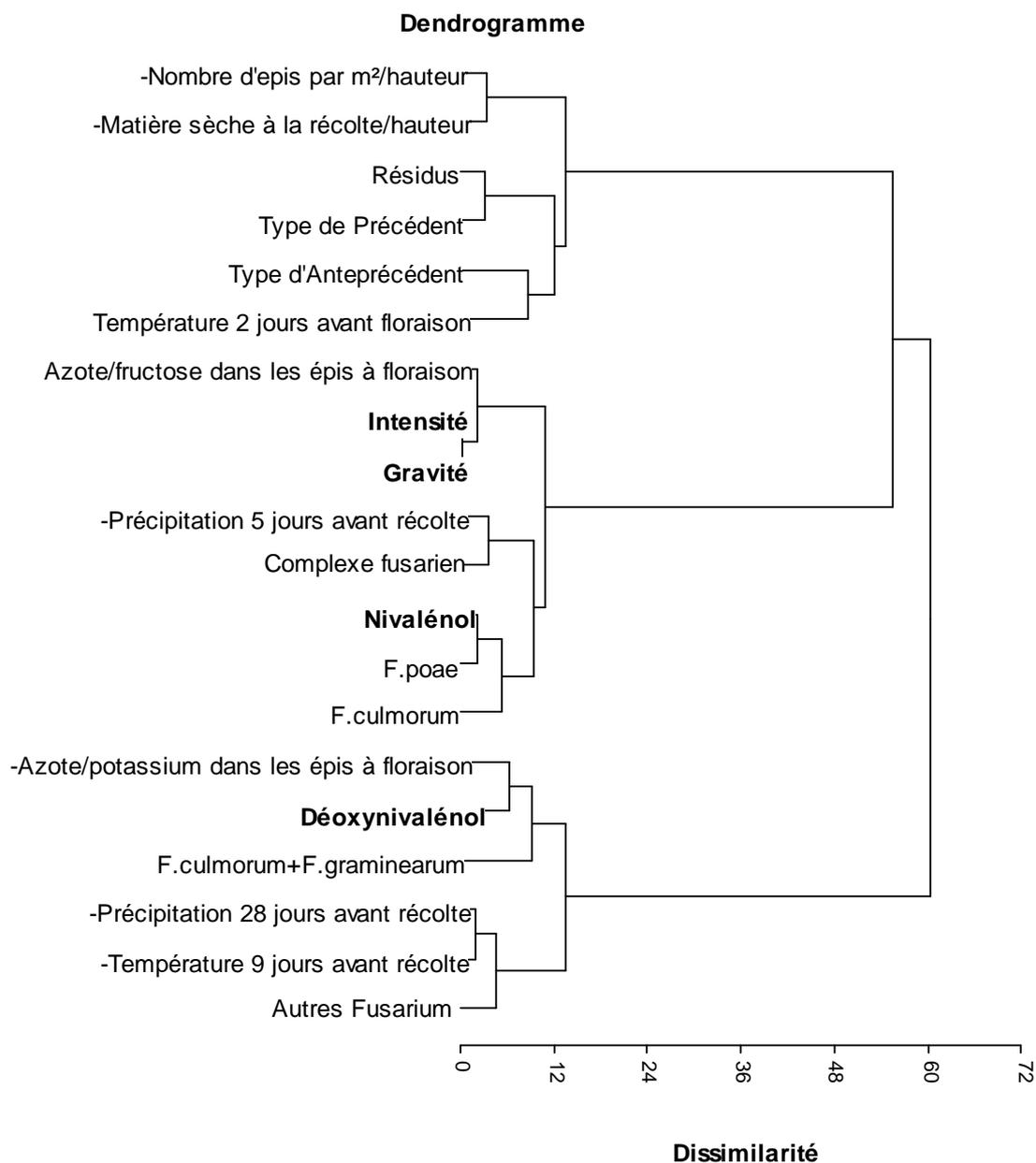
La troisième hypothèse concerne la contribution de *F. graminearum* et *F. culmorum* aux niveaux d'attaque des épis. L'inutilité apparente de ces espèces pourrait traduire soit une agressivité très réduite de ces espèces, soit (et c'est bien plus probable) le fait qu'elles **ne colonisent que tardivement les épis**. Ceci corroborerait par ailleurs, les productions tardives de déoxynivalénol observées au chapitre 4.

La littérature a déjà suggéré que la production des mycotoxines fusariennes ne dépendait pas de l'ensemble des espèces du complexe, mais de la capacité génétique de certaines des souches de ces espèces à produire ces toxines (Mirocha *et al.*, 1989 ; Jin and Yoshizawa, 1994 ; Hestbjerg *et al.*, 2000 ; Bakan *et al.*, 2002 ; Cromey *et al.*, 2002 ; Hestbjerg *et al.*, 2002). Dans notre étude, les souches de *F. equiseti* isolées se sont par exemple révélées génétiquement incapables de produire des trichothécènes. Bien que la distinction fine des différents chémotypes de champignons ne soit pas apparue comme centrale dans le déterminisme de la production de mycotoxines, nous avons vu sur nos parcelles que **la production de déoxynivalénol était plutôt liée à *F. graminearum* et *F. culmorum*, tandis que la production de nivalénol était plutôt liée à *F. poae*, *F. graminearum* et *F. culmorum* en cas de culture sans traitement fongicide, et majoritairement à *F. poae* et *F. culmorum* en cas**

**de traitements fongicides.** Ces résultats confirment les observations faites à l'échelle européenne par Bottalico et Perrone (2002), à savoir que *F. graminearum* et *F. culmorum* sont les plus grands producteurs de déoxynivalénol et *F. poae*, *F. graminearum* et *F. culmorum* les premiers producteurs de nivalénol.

**Quelle que soit la toxine considérée, l'infection par *F. culmorum* semble avoir été très importante** pour nos parcelles, alors même que cette espèce était bien moins présente que *F. graminearum*. L'implication spécifique de *F. culmorum* (et notamment les conditions de son développement) est un point particulièrement important qu'il faudrait sans doute approfondir dans le futur. En effet, sur l'essai systèmes, **cette espèce est significativement plus présente dans le système sans travail du sol avec couverture permanente**, qui est aussi le système de culture le plus contaminé (**Chapitre 5**). Une première explication à la forte implication de *F. culmorum* dans la production des différentes mycotoxines est **l'équilibre relatif qui existe entre les souches de cette espèce** potentiellement capables de produire plutôt du déoxynivalénol et celles potentiellement capables de produire plutôt du nivalénol. En revanche, dans l'espèce *F. graminearum* la plus grande majorité des souches présente un fort potentiel de production de déoxynivalénol, et peu de souches vont donc préférentiellement produire du nivalénol. Par ailleurs, il est aussi possible que (i) la date d'infection des souches de cette espèce corresponde à une période critique vis-à-vis de la production en mycotoxines, ou que (ii) ces souches réagissent de façon plus importante aux différents stress environnementaux, ou encore aux compétitions inter-espèces. En effet, nous avons noté que **l'ensemble des *Fusarium* pouvait peut-être également stimuler la production de déoxynivalénol par certaines d'entre elles**. Cette hypothèse pourrait aussi concerner la production de nivalénol, mais cela n'a pas pu être mis en évidence, dans notre gamme de contamination et d'infection. Cet effet paradoxal de la présence de souches non productrices souligne **l'importance de lutter contre l'ensemble du complexe fusarien (et pas seulement contre quelques espèces du complexe) pour pouvoir respecter une norme maximale de contamination**. Ces résultats étant particulièrement importants pour guider l'utilisation des fongicides, il semble que comme bien d'autres, ils devront faire l'objet d'explorations complémentaires.

**Figure 6-6-1 : Classification ascendante hiérarchique de l'ensemble des variables d'importance sur les parcelles agricoles en 2002-03**



Les différentes variables qualitatives sont codées de telle sorte que le risque le plus grand (selon la littérature) soit associé au code le plus fort (**Chapitre 3**). Le signe – rend compte d'un sens de variation négatif d'une variable quantitative dans cette classification.

Nous venons de souligner l'importance des espèces et des souches présentes et probablement de leur date d'apparition sur les grains, et ce en fonction de pratiques culturales. Même si ces résultats demandent à être vérifiés sur des gammes d'infection, d'attaque et de contamination beaucoup plus larges que les nôtres, ils semblent confirmer le pari de départ de cette thèse, c'est-à-dire que la compréhension de la relation symptômes-toxines en parcelles agricoles sous contamination naturelle nécessite aussi l'étude détaillée des populations de pathogènes présentes. De fait, la hiérarchisation de l'ensemble des éléments qui se sont révélés importants au cours des chapitres 5 et 6 sur les parcelles du réseau en 2002-03 (**Figure 6-6-1**) montre que **la contamination par déoxynivalénol, si elle est fortement reliée au rapport entre les taux d'azote et de potassium dans les épis à la floraison, et (négativement) à la pluviométrie pendant les 28 jours avant la récolte et à la température pendant les 9 jours précédant la récolte, l'est aussi fortement au taux d'infection par *F. culmorum* et *F. graminearum*, et au taux d'infection par les autres espèces de *Fusarium*.**

**La contamination en nivalénol et les niveaux d'attaque par la fusariose, apparaissent eux aussi comme essentiellement dépendants du rapport entre les taux d'azote et de fructose dans les épis à la floraison, mais aussi du taux d'infection par les espèces présentes.** Les autres caractéristiques du couvert (densité, hauteur et résidus), de l'itinéraire technique (histoire culturale) et du climat, sont agrégés ensemble sur une autre branche du dendrogramme.

L'identité exacte des champignons responsables de la fusariose et de la production des mycotoxines associées va donc nécessairement influencer les éventuelles prévisions des niveaux d'attaque et de contamination qui pourraient être faite par modélisation : climat et profil d'espèces à l'origine de la maladie et/ou de la contamination sur lequel le modèle a été créé devront être renseignés, pour encadrer plus justement son utilisation.

Enfin, pour conclure, il semble bien que ce soit **une approche dynamique de la microbiologie du grain** (quelle population de pathogènes est présente sur les grains ? quand arrive-t-elle ? dans quel ordre arrivent les différentes espèces ? et comment la population de pathogènes est-elle modifiée par son environnement ?) qui permettra d'avancer dans la compréhension des niveaux d'attaque de fusariose de l'épi et de contamination par les mycotoxines associées.



## Conclusion générale

Notre étude de l'effet de différents modes de conduite des cultures sur le développement de la fusariose du blé et la contamination en mycotoxines qui en résulte s'inscrit dans un contexte d'attente importante concernant la sécurité sanitaire des aliments. Prochainement, après les Etats-Unis, le Canada et de nombreux autres pays, l'Europe devrait adopter une nouvelle recommandation sur les teneurs maximales en mycotoxines admissibles dans les céréales : la proposition actuelle de la commission européenne DG-SANCO (Direction Générale – SANté et protection des CONsommateurs) pour la future recommandation européenne est de 1000 µg de déoxynivalénol par kg de grains (il n'y a pas pour l'instant de proposition pour le nivalénol). Dans ce contexte, notre travail apporte plusieurs types de contributions, en se démarquant des travaux agronomiques antérieurs par la prise en compte explicite des interactions nécessaires entre différents champs disciplinaires (agronomie et pathologie), et par une approche fondée sur des situations proches des situations agricoles réelles. Ces choix nous ont semblés essentiels pour tenter de répondre aux questions posées au départ de ce travail, et que l'on peut résumer de la manière suivante : *quelles relations existe-t-il entre les symptômes de fusariose, la production de toxines et les pratiques agricoles ?*

Tout d'abord, toute recommandation ou norme officielle implique une méthode de prélèvement standardisée. Sur cet aspect, et sans chercher à éditer pour les organismes de collecte un guide des bonnes et des mauvaises pratiques de prélèvement pour les analyses en routine, **notre travail discute les bases de la réalisation de prélèvements pour des dosages toxicologiques** dans le cadre d'une recherche agronomique. D'abord, on se rappellera que le résultat de ces dosages ne correspond pas forcément à la totalité de la production des toxines, puisqu'au moment du dosage une partie des toxines a pu être déjà dégradée par la plante (c'est un des mécanismes de résistance des plantes) : la teneur en toxine que l'on mesure à un moment donné n'est que la résultante d'une production suivie d'une dégradation. Notons d'ailleurs que nous n'avons aucune information sur le devenir des produits de dégradation des toxines par les plantes, alors qu'il est possible qu'ils soient plus dangereux pour la santé que les toxines initiales (Galtier, *com. pers.*). Ensuite, nos résultats indiquent que la comparaison des niveaux de contamination de deux parcelles ne peut se faire que sous certaines conditions de prélèvement au champ (avoir échantillonné toute la parcelle et en récolter le maximum) et de préparation des échantillons (très bien trier les grains des poussières et des autres parties de la plante beaucoup plus contaminées que les grains, et broyer le maximum de grains afin d'homogénéiser les niveaux de contamination très différents des différents grains), avant envoi au laboratoire d'analyse. Sous l'hypothèse que la variabilité rencontrée sur les 15 parcelles que nous avons échantillonnées correspond bien à la variabilité de contamination de l'ensemble des parcelles, nous avons pu établir que si l'écart entre la contamination de deux parcelles est de plus de 70 µg/kg de déoxynivalénol et de plus de 30 µg/kg de nivalénol, alors les deux parcelles présentent des niveaux de contaminations différents. Ces deux valeurs d'incertitudes du dosage de toxines sont plus petites que la variabilité de la contamination en mycotoxines d'une parcelle à l'autre, et les différences de contamination entre nos parcelles sont donc significatives. Sans être directement transposables à des prélèvements réalisés dans le cadre de transactions marchandes ou d'évaluations de contrôle, ces résultats acquis dans un cadre de recherche agronomique constituent sans doute des pistes de réflexion utiles pour la mise au point de standards ou de guides pour les prélèvements réalisés dans ces autres contextes.

Ensuite, une exigence officielle de ne pas dépasser un certain taux de contamination en toxine rend désirable, pour les organismes stockeurs, de savoir prévoir les niveaux de contamination avant la récolte. Sur ce point, notre suivi de la contamination en mycotoxine au cours du remplissage des grains montre que tant que nous ne connaissons pas mieux les déterminismes de la production de ces mycotoxines, **il est illusoire de penser pouvoir prévoir la teneur des grains en mycotoxines à la récolte à partir de leur contamination en cours de remplissage.**

Notons toutefois que les modèles de prédiction sont toujours inféodés aux situations culturales rencontrées. Dans notre cas, **les niveaux d'attaque et de contamination ont été faibles**, mais néanmoins non négligeables : la contamination en déoxynivalénol de la majorité de nos parcelles agricoles se situe en dessous du seuil de 1000 µg/kg qui pourrait être la future recommandation européenne, et dans l'ensemble de nos dispositifs, seules 8 parcelles dépassent cette recommandation ; même si certaines la dépassent de beaucoup, avec un maximum à 9100 µg/kg, on est encore loin des niveaux de contamination rencontrés dans l'étude de Cromey *et al.* (2002) en Nouvelle-Zélande, où la valeur maximale était de 32500 µg/kg sur une parcelle expérimentale, ou des 50000 µg/kg de déoxynivalénol obtenu sur un échantillon de farine de blé en Europe (Scientific Cooperation (SCOOP), 2003). Bien sûr, l'interprétation de nos résultats est rendue plus difficile par la faiblesse des gammes de variation observées, qui n'est jamais propice à la mise en évidence d'un effet, mais des attaques trop fortes n'auraient pas forcément été représentatives de la réalité française, au vu des différentes données actuellement disponibles.

Contrairement à certaines études réalisées en conditions de très fortes attaques (ou en conditions contrôlées), notre étude ne trouve **pas de corrélation entre les niveaux d'intensité et de gravité des symptômes de fusariose et les niveaux de contamination en mycotoxines**, que ce soit vis-à-vis du déoxynivalénol ou vis-à-vis du nivalénol, les deux toxines les plus présentes dans nos résultats, en cohérence avec ce qui est avéré déjà observé dans nos régions. De ce fait, notre conclusion est que (i) **la prédiction de la future contamination des grains par des mycotoxines ne peut pas se faire à partir d'une simple évaluation de leurs symptômes de fusariose**, et (ii) le classement des variétés de blé selon leur résistance aux maladies ne peut pas non plus être utilisé directement pour choisir des variétés produisant peu de toxines. En effet, ce classement est classiquement réalisé à partir des symptômes de ces maladies (dont la fusariose). Un nouveau classement des variétés, selon leur résistance à la production de toxines, est donc nécessaire. Ce classement étant susceptible de dépendre du pathogène infectant, comme le mentionne notre étude, il nécessite des caractérisations génétiques et toxicologiques.

Aussi bien à cause de la future recommandation européenne qu'à cause de la préoccupation générale de la société vis-à-vis de la sécurité sanitaire, **connaître les origines et les causes de la production des mycotoxines dans les céréales** devient une préoccupation majeure. Une telle connaissance donnerait les meilleures chances pour, d'une part, mettre au point des modes de conduite agricole et de transformation agroalimentaire plus sûrs, et d'autre part pouvoir prévoir avant la récolte la production commercialisable. Dans ce domaine, l'interprétation de nos résultats a été de nombreuses fois confrontée aux **lacunes de la littérature sur l'épidémiologie de la maladie**. Par exemple, une étude dynamique (c'est-à-dire tout au long du remplissage des grains) de la microbiologie du grain pourrait peut-être permettre d'aller plus loin dans l'identification des déterminants et des mécanismes à l'origine de la fusariose de l'épi et de la contamination des grains par les mycotoxines associées.

D'ailleurs, nos résultats ne sont pas toujours conformes à ceux de littérature. Ainsi, aucun résultat ne semble confirmer la **dispersion par "splashing" des spores des champignons**, à la floraison du blé. Notre étude montre aussi que le climat est sans conteste un élément déterminant dans la production de déoxynivalénol, mais l'importance de la pluviométrie à la floraison y est grandement relativisée, notamment par l'observation d'attaques et/ou de contaminations plus tardives pendant la période de remplissage des grains, et aussi par l'importance de la température. Au niveau **de l'infection et/ou de la propagation des champignons** dans les épis, notre étude permet également d'attribuer un rôle important à l'état nutritionnel du couvert : **les niveaux d'attaque des épis augmentent avec le rapport des taux d'azote et de fructose, tandis que la production de déoxynivalénol dans les grains est plus élevée quand le rapport des taux d'azote et de potassium diminue**. Ces résultats, nouveaux dans la littérature, sont confortés par d'autres obtenus à propos de l'infection des grains,

puisque'il semble ressortir de nos résultats que les mêmes paramètres de nutrition interviennent aussi dans l'implantation des agents de la fusariose sur les épis. Enfin, la **date d'infection des différentes espèces** et une **certaine spécificité des espèces présentes** selon le système de culture (notamment en absence de travail du sol) apparaissent, dans nos résultats, comme pouvant également conditionner les niveaux d'attaque et de contamination (à notre connaissance, cela n'a pas encore été étudié par d'autres) : en effet, si nous montrons que les niveaux de fusariose de l'épi sont bien corrélés à la présence de l'ensemble des champignons connus pour être responsables de la fusariose, ce n'est pas le cas pour les deux espèces, *F. graminearum* et *F. culmorum* prises isolément, qui pourraient peut-être avoir infecté nos parcelles plus tardivement.

La production de mycotoxines dépend principalement des espèces de champignons toxigènes présentes ; nous suggérons néanmoins aussi, sans toutefois pouvoir le vérifier, que d'autres espèces, non toxigènes (champignons du complexe fusarien lui-même, ou peut-être même d'autres champignons présents sur le grain), pourraient également intervenir indirectement sur la production de toxines, par compétition ou au contraire en synergie avec les espèces toxigènes. Par ailleurs, la faible proportion des grains contaminés par *F. culmorum* a une forte influence sur les contaminations en déoxynivalénol et en nivalénol : si l'on compare différents systèmes de culture, cette espèce est plus présente dans les systèmes sans travail du sol avec couverture permanente (qui donnent également lieu à des productions de toxines élevées) que dans les autres. Nous croyons que l'influence de *F. culmorum* devrait faire l'objet de recherches plus poussées, pour (i) vérifier nos observations dans d'autres environnements, (ii) déterminer ce qui, dans des conditions environnementales données (climatique, nutritive et/ou de résistance des plantes) pourrait influencer la production de cette espèce ou de certaines de ces souches, et (iii) étudier la productivité potentielle des diverses souches de cette espèce pour déterminer si certaines sont hyperproductrices en toxines.

Contrairement à de nombreuses études publiées, nous n'avons observé aucun effet du travail du sol sur les symptômes de fusariose, guère d'influence de l'existence d'une culture de maïs précédant une culture de blé sur les symptômes de fusariose comme sur la contamination en mycotoxines, guère d'influence de l'absence de traitement fongicide sur les deux mêmes caractéristiques. Notons que beaucoup des études agronomiques sur la fusariose sont faites sous contamination artificielle, ce qui influence fortement le complexe parasitaire responsable de la maladie et des mycotoxines associées. A ce stade, il est très important de rappeler que les divers agents responsables de la fusariose ne produisent pas tous les mêmes toxines (ni en même quantité), et qu'ils ne sont pas tous systématiquement présents sur un blé infecté dans une région donnée du monde. Comme on l'a déjà rappelé dans les chapitres précédents, une espèce est particulièrement dominante en Amérique du Nord, *F. graminearum*, alors qu'en Europe il semble que les profils d'espèce soient plus diversifiés. En outre, au Canada et aux Etats-Unis, on détecte peu de nivalénol, et comme ce sont ces pays qui publient le plus sur le sujet, une faible proportion des études publiées traite de cette toxine. **La différence entre nos résultats et ceux de la littérature pourrait bien s'expliquer en partie par la diversité des souches pathogènes européennes.**

**Un autre élément expliquant ces différences réside sans doute aussi dans l'importance, pour le développement du complexe fusarien, de la nutrition des plants de blé** : beaucoup de nos données ont été recueillies dans des parcelles menées en agriculture biologique, et donc, de ce fait, en situation de relative carence (cf ci-dessous). Bien sûr, d'autres hypothèses sont imaginables pour expliquer les différences entre nos résultats et ceux de la littérature, par exemple les conditions climatiques de notre étude, qui ne sont pas les mêmes que celles de la majorité des études (réalisées au Canada, aux Etats-Unis, et pour quelques-unes en Angleterre) : le climat a été particulièrement sec sur nos régions pendant ces deux années d'études, alors que dans ces autres pays, il est généralement plus chaud et humide au moment de la floraison.

Par ailleurs, beaucoup des travaux agronomiques s'intéressant à la fusariose sont aussi menés au moyen d'expérimentations ne permettant guère la prise en compte des interactions entre pratiques agricoles, et ne couvrant pas bien les gammes de variation observées en parcelles agricoles (comme les fortes carences azotées). Nos résultats étant obtenus sous contamination naturelle et pour la plupart en parcelles agricoles biologiques, ceci pourrait aussi expliquer les différences de résultats observées avec ceux de la littérature.

En terme de systèmes de culture, nous avons noté tout au long de l'étude que les parcelles cultivées en **agriculture biologique** (aussi bien les parcelles agricoles que celles de l'essai) étaient **moins attaquées** par la fusariose que les autres, et généralement **peu contaminées par les toxines fusariennes**, du moins dans nos conditions climatiques et nutritionnelles. Les parcelles conduites en agriculture biologique sur l'essai systèmes pendant l'année 2000-01 font exception, puisqu'on y a trouvé beaucoup de toxines alors qu'il n'y en avait que peu ailleurs. Ceci laisse supposer que certains déterminants des niveaux de contamination n'ont pas encore été identifiés, à moins que l'explication ne réside dans les taux d'infection des différents systèmes de culture par les différents champignons de l'année culturale : pour les deux années 1999-00 et 2000-01 nous ne disposons pas en effet de la mesure des taux d'infection par les différentes espèces. Il est par ailleurs possible que des compétitions entre pathogènes ou des situations de stress particulières n'aient pas encore été identifiées à ce jour.

D'une manière générale, nous pouvons considérer que nous sommes un peu en-deçà des résultats que nous avons espérés en matière d'identification des effets des systèmes de culture sur les contaminations en toxines. Notre étude de parcelles cultivées en agriculture biologique permet cependant tout d'abord de donner des références agronomiques à de telles parcelles (ce qui n'est pas fréquent), comme par exemple les états de densité ou de carence azotée de ces parcelles ou encore leurs infestations en maladie comme en adventices. Dans notre étude, ces parcelles montrent des indices de nutrition azotée évocateurs de carences et des productions de toxines assez faibles. Cette situation pourrait bien limiter l'impact de notre travail, que nous pensions *a priori* transposable du système biologique au système conventionnel. En effet, il est possible qu'en état nutritionnel plus favorable, d'autres facteurs soient à l'œuvre : nos résultats ne seraient alors plus aussi facilement transposables que prévu, en raison de l'impact de la nutrition sur les taux d'infection et les niveaux de contamination.

**La méthode du diagnostic agronomique que nous avons appliquée a donc permis de tester, dans des situations agricoles concrètes, des hypothèses largement répandues dans la littérature, et suggère d'en relativiser quelques-unes.** Par ailleurs, **notre travail a permis de mettre en évidence la grande variabilité des contaminations en mycotoxines des parcelles et la distribution de ces contaminations** : beaucoup de parcelles peu contaminées, et quelques-unes très contaminées. Ce résultat est retrouvé dans les différents plans de surveillance réalisés en France ces dernières années (Direction Générale de l'Alimentation, 2002). Ainsi en 2001, sur 92 lots de grains de blé et d'orge analysés pour la DGAL, plus de 80% d'entre eux présentaient moins de 10 µg/kg de déoxynivalénol, 99% présentaient moins de 500 µg/kg de déoxynivalénol, et 1% présentait entre 2100 et 2200 µg/kg de déoxynivalénol. De même, plus de 90% présentaient moins de 10 µg/kg de nivalénol, 99% des lots présentaient moins de 100 µg/kg de nivalénol, quand 1% présentait entre 200 et 300 µg/kg de nivalénol. En 2003 ce type de distribution a également été retrouvé (Ioos, *com. pers.*). **Il pourrait, en fait, se révéler aussi important, voire plus important, de déterminer ce qui est à l'origine des contaminations exceptionnelles (et de savoir si le système de culture peut influencer ces éléments) que de chercher (comme nous l'avons fait, pour l'essentiel) à expliquer les variations des parcelles plus faiblement contaminées.**

**Peut-être la méthode du diagnostic agronomique a-elle été néanmoins un peu prématurément appliquée** à ce sujet de recherche **pour guider l'évolution des systèmes de culture**. Certes, de nombreux travaux de diagnostic ont montré qu'il était possible de concevoir des systèmes de culture visant à garantir de bons rendements tout en rationalisant l'emploi des pesticides contre les maladies cryptogamiques telluriques du blé (Colbach, 1995), en jouant notamment sur les interactions entre les éléments du système de culture. Mais dans notre travail, à cause des préoccupations de sécurité sanitaire et de protection intégrée, nous nous intéressons non plus seulement à garantir un rendement en grains, mais aussi à garantir la qualité sanitaire de ceux-ci. Ceci entraîne des différences notables. D'une part, la production des toxines fusariennes n'est pas toujours corrélée aux symptômes visibles, et une attaque visible des grains par la fusariose ne s'accompagne pas systématiquement d'une diminution des rendements. D'autre part, la production de toxines par le pathogène infectant est susceptible d'être influencée à de multiples étapes par les caractéristiques génétiques des diverses variétés de blé, alors que le rendement de ces variétés résulte de paramètres moins nombreux, puisqu'il dépend uniquement des capacités d'absorption et de transfert du carbone dans les plantes (capacités qui sont peu différentes entre génotypes). Ces différences compliquent fortement le système à étudier. La méthode de diagnostic agronomique repose de plus sur une bonne identification des déterminants et une bonne compréhension des mécanismes du phénomène à expliquer. **Or les déterminants et les mécanismes des attaques de fusariose de l'épi et des contaminations par les mycotoxines associées ne sont pas encore vraiment établis**. En ce sens, ce travail de thèse témoigne de l'ouverture nécessaire des diagnostics agronomiques à des méthodes plus éloignées de leur champ d'origine, comme la détermination des espèces et des potentiels toxinogènes des souches infectantes. **Une étude dynamique (c'est-à-dire, tout au long du remplissage du grain) des microorganismes présents sur le grain pourrait peut-être également permettre d'aller plus loin dans l'identification des déterminants et la compréhension des mécanismes de contamination par les toxines fusariennes**, notamment en ce qui concerne l'effet des traitements fongicides, qui semble essentiellement intervenir sur la date d'infection des grains par les différentes espèces de champignons du complexe fusarien, et donc la compétition ou les synergies entre ces espèces.

## *Perspectives*

Analyser un risque toxicologique consiste d'abord à évaluer la probabilité que l'exposition d'individus à des substances toxiques produise des effets néfastes sur leur santé. Puis, il s'agit d'élaborer des solutions afin de minimiser cette probabilité. Enfin, l'analyse se termine par des échanges d'informations entre les parties concernées (celles qui évaluent le risque, celles qui le gèrent, celles qui le subissent) (Malmauret-Rossignol, 2002). **Dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments, notre travail participe à une telle analyse de la minimisation des risques liés à la fusariose du blé**. Avant toute extrapolation de nos résultats, cependant, il faudra se rappeler que les résultats que nous avons obtenus sur les systèmes de culture sont issus d'une seule expérimentation de quatre années, dont deux seulement plus détaillées, ce qui ne représente pas une large gamme de situations. Par ailleurs, avant l'introduction de ces résultats dans les modèles de toxicologie pour comparer le risque alimentaire lié à l'utilisation de farine issue de l'agriculture biologique *versus* celui lié à l'utilisation de farine issue de l'agriculture non biologique, il reste à prendre en compte les "effets d'allotements" : les farines boulangères ou de biscuiterie sont réalisées en mélangeant les grains récoltés de différentes parcelles (Le Bail, 1997). Ce ne sont donc pas les niveaux de contamination des grains d'une parcelle qui doivent servir dans ces modèles mais des mélanges de grains de différentes parcelles et différentes contaminations.

Ce qui ressort principalement de notre étude, c'est **la nécessité, pour tenter d'y comprendre quelque chose, d'évaluer conjointement les symptômes de fusariose, les contaminations en mycotoxines**

**fusariennes, et les diverses espèces ou souches pathogènes présentes** et responsables de la fusariose (et probablement aussi les divers autres microorganismes présents sur l'épi). Nous intéresser, dans ce travail, à ces trois aspects nous a permis d'émettre des hypothèses sur les raisons des effets ou de l'absence d'effets de telle ou telle pratique culturale, sans nous arrêter uniquement à l'observation de l'effet. Ne pas avoir tenu compte de l'ensemble de ces trois aspects est probablement une des raisons principales des contradictions apparentes dans la littérature. ***Dans l'avenir, il nous semble très important que ces trois aspects soient vraiment considérés ensemble, pour permettre, à terme, de guider la définition de systèmes de culture minimisant les attaques de fusariose de l'épi et les risques sanitaires associés.***

Ce qui ressort aussi, c'est la difficulté, même en conjuguant ces trois aspects, d'y voir clair à partir d'un nombre nécessairement réduit de situations expérimentales. Ceci pourrait entre autre résulter de la particularité des mycotoxines qui sont des produits du métabolisme d'un champignon en état de stress (Thouvenot, 2002) ; cette particularité pourrait suggérer une hypothèse (déjà évoquée en partie) permettant d'expliquer la relative fragilité de la plupart de nos corrélations entre variables environnementales ou pratiques culturales et contamination par les toxines. Dans ce contexte, on devrait en effet s'attendre (pour ce qui concerne le climat par exemple, mais aussi peut-être du point de vue de plusieurs des autres paramètres modulateurs évoqués dans cette thèse) à ce que la production de toxine ne soit pas corrélée linéairement à un paramètre donné (par exemple à une chaude humidité qui favoriserait la croissance du pathogène), mais soit l'objet d'un compromis entre la nécessité d'avoir suffisamment de champignons pour qu'ils sécrètent beaucoup de toxines, et la nécessité de faire "souffrir" ces champignons pour déclencher leurs réactions anti-stress. **Il faut donc identifier dans chaque situation (*a priori* différente des autres), quels éléments de l'environnement des champignons sont perçus par le champignon comme des "stress" induisant la synthèse de mycotoxines.** Cette hypothèse pourrait être potentiellement intéressante pour guider (paradoxalement) les stratégies de protection *chimique* contre la production de toxines : trouver non pas des molécules perturbant le *développement* des champignons, comme les fongicides, mais des molécules affectant la *réponse des champignons à des états de stress*.

Ce travail de thèse nous apparaît comme un travail préliminaire ouvrant la porte à de nombreux autres travaux possibles sur le sujet, pour vraiment comprendre le développement de la fusariose des épis et la production des mycotoxines associées. Ainsi, les résultats agronomiques demandent à être approfondis, et l'épidémiologie au champ de la fusariose de l'épi demande à être mieux renseignée : quels facteurs influencent la croissance des champignons et leur production de toxines, et comment le font-ils ? Notre analyse du potentiel toxigène des souches n'a pas permis d'explicitier, autant qu'espéré, les relations entre pratiques culturales et symptômes, entre pratiques culturales et toxines, et entre symptômes et toxines, et n'a pas vraiment débouché sur la révélation des mécanismes à l'œuvre. Néanmoins, cette analyse suggère d'autres pistes de recherche possibles, notamment la recherche d'éventuels gènes régulateurs de la production de ces toxines, ainsi que l'étude plus particulière des souches de *F. graminearum* de potentiel toxigène "indéterminé".

Plusieurs autres thèmes de recherche semblent à ce jour concevables :

- l'origine des effets éventuels du climat : sur la conservation, la sporulation, la dispersion, l'infection, la sélection des espèces dominantes ?
- l'origine de l'inefficacité des fongicides : effet sur la date de colonisation, sur l'espèce affectée ?
- l'importance de "l'effet souche" : les chémotypes identifiés génétiquement sont-ils influants ou bien est-ce l'environnement des souches qui est le facteur prépondérant de la production des toxines ?

- les voies de dissémination possibles des champignons jusqu'aux grains (voies aériennes ou voie systémique), selon les différentes espèces ?
- les effets de la richesse nutritive des couverts sur l'infection par les pathogènes : mêmes effets sur toutes les espèces ? effets sur la date de colonisation ?
- l'influence de la compétition ou de la synergie entre champignons du complexe fusarien, notamment sur la production de toxines : en relation avec l'effet des traitements fongicides ?

Et plus spécifiquement :

- l'étude spécifique de nos parcelles très fortement contaminées ?
- l'étude de la variété *Isengrain* versus d'autres variétés, en système conventionnel ou biologique ?
- les effets de la présence de *F. culmorum* dans un champ, en termes de synergie, compétition ou hyperproductivité ?

A l'interface de beaucoup de ces études, **le rôle de l'environnement du champignon (environnement climatique, environnement nutritif, et compétition ou synergie entre les diverses espèces de champignon) représente probablement un paramètre majeur, influençant aussi bien l'intensité de l'attaque fusarienne que la production de toxines, et susceptible d'être modulé par les différentes pratiques culturales.**



## Références

Seules les références citées dans le texte même de cette thèse sont mentionnées ici, celles présentes spécifiquement dans les articles publiés ne sont pas répétées, pour ne pas alourdir le document.

- AFSSA, 2002. Evaluation des risques et des bénéfices sanitaires et nutritionnels des aliments issus de l'agriculture biologique.
- Agence bio, 2004. Observatoire économique de l'agriculture biologique - Résultats 2004.
- Agreste, 2004. <http://www.agreste.agriculture.gouv.fr>.
- Alabouvette C., Couteaudier Y., and Louvet J., 1985a. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XI- Etude comparative du comportement des *Fusarium* spp. dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires enrichis en glucose. *Agronomie*, 5(1), 63-68.
- Alabouvette C., Couteaudier Y., and Louvet J., 1985b. Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XII- Activité respiratoire dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires enrichis en glucose. *Agronomie*, 5(1), 69-72.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., and Lipman D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D. J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Anonyme, 2000. Fusarioses - Se méfier des idées reçues. *Cultivar, supplément*, 487, 36-37.
- Armitage D., 2003. Grain sampling methods to achieve consumer confidence and food safety. In HGCA Research Review Home Grown Cereals Authority, London UK.
- Atanasoff D., 1920. *Fusarium* blight (scab) of wheat and other cereals. *Journal of Agricultural Research*, 20(1), 1-32.
- Bai G. H., Plattner R., Desjardins A. E., and Kolb F., 2001. Resistance to *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. *Plant Breeding*, 120, 1-6.
- Bakan B., 1998. Thèse - Approche physiologique de la biosynthèse des trichothécènes par *Fusarium*, INA P-G, 1-150.
- Bakan B., Giraud-Deville C., Pinson L., Richard-Molard D., Fournier E., and Brygoo Y., 2002. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5472-5479.
- Bakan B., Pinson L., Cahagnier B., Melcion D., Sémon E., and Richard-Molard D., 2001. Toxicogenic potential of *Fusarium culmorum* strains isolated from French wheat. *Food Additives and Contaminants*, 18(11), 998-1003.
- Ban T., 2000. Review-Studies on the genetics of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in wheat. In International symposium on wheat improvement for scab resistance. Section II. Genetic analysis and gene mapping for scab resistance. Kansas State University Printing, Manhattan, Kansas, Suzhou and Nanjing, Chin. (J. Raupp, Z. Ma, P. Chen and D. Liu, eds.), 82-93.
- Barbottin A., 2004. Thèse - Utilisation d'un modèle de culture pour évaluer le comportement des génotypes: Pertinence de l'utilisation d'Azodyn pour analyser la variabilité du rendement et de la teneur en protéines du blé tendre, INA P-G, Paris, 1-181+annexes.
- Birzele B., Meier A., Hindorf H., Krämer J., and Dehne H. W., 2002. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 667-673.
- Blaney B. J., and Dodman R. L., 2002. Production of zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol, and acetylated derivated by Australian isolates of *Fusarium graminearum* and *F. pseudograminearum* in relation to source and culturing conditions. *Australian Journal of Agricultural Research*, 53, 1317-1326.
- Boiffin J., Caneill J., Meynard J. M., and Sebillotte M., 1981. Elaboration du rendement et fertilisation azotée du blé d'hiver en Champagne crayeuse. I- Protocole et méthode d'étude d'un problème régional. *Agronomie*, 1(7), 549-558.

- Bottalico A., 1998. *Fusarium* diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2), 85-103.
- Bottalico A., Lerario P., and Visconti A., 1983. Production of mycotoxins (zearalenone, trichothecenes and moniliformin) by *Fusarium* species in Italy. *M.A.N. Microbiologie, Aliments, Nutrition*, 1, 133-142.
- Bottalico A., and Perrone G., 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 611-624.
- Brooking I. R., and Kirby E. J. M., 1981. Interrelationships between stem and ear development in winter wheat: the effects of a Norin 10 dwarfing gene, Gai/Rht<sub>2</sub>. *J. Agric. Sci. Camb.*, 97, 373-381.
- Cahagnier B., 2002. Les mycotoxines des céréales. In *Mycotoxines: un prochain enjeu de sécurité alimentaire?* (CERAAF, ed.), 18-24.
- Calvet R., 2003. Le sol - Propriétés et fonctions, (France Agricole, ed.), Dunod, Paris, 1-456.
- Carlier B., 2001. Les fusarioses: des maladies dures à combattre. *Jeunes agriculteurs*, 557, <http://ja.web-agri.fr/moteur/557/557P36.html>.
- Caron D., 1993. Les Fusarioses. In *Maladies des blés et orges* (ITCF, ed.), 30-39.
- Caron D., 2000. Fusarioses des épis. Sait-on prévoir leur développement? *Perspectives Agricoles*, 253, 56-62.
- Carter J. P., Rezanoor H. N., Holden D., Desjardins A. E., Plattner R. D., and Nicholson P., 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 573-583.
- Casale W. L., and Hart L. P., 1986. Inhibition of protein synthesis in maize by trichothecene mycotoxins, Abstract. *Phytopathology*, 76, 1144.
- Cassini R., 1970. Facteurs favorables ou défavorables au développement des fusarioses et septorioses du blé. In *Proceeding of meeting of sections cereals and physiology*, Dijon. (Eucarpia, ed.), 271-279.
- Cassini R., 1973. Influences des techniques de culture sur le développement des maladies des céréales. Chap. Méthodes de lutte culturale, génétique et biologique. In *La lutte contre les maladies des céréales* (C. R. ITCF, ed.), Versailles, 17-34.
- Chandelier A., Kestemont M. H., Detrixhe P., Cavalier M., and Pierard J. Y., 2003. Fungal pathogens associated with head blight in wheat: a 3-year analysis in Belgium. *Aspects of Applied Biology*, 68, 187-191.
- Chelkowski J., 1991. Fungal pathogens influencing cereal seed quality at harvest. In *Cereal grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Cité par *Ruckebauer et al. 2001* (J. Chelkowski, ed.) *Developments in Food Science*, 26, Elsevier, Amsterdam, 53-56.
- Chelkowski J., Wisniewska H., Adamski T., Golinski P., Kaczmarek Z., Kostecki M., Perkowski J., and Surma M., 2000. Effects of *Fusarium culmorum* head blight on mycotoxin accumulation and yield traits in barley doubled haploids. *Journal of Phytopathology*, 148, 541-545.
- Chen L. F., Song Y. L., and Xu Y. G., 1996. Variation in the concentrations of deoxynivalenol in the spikes of winter wheat infected by *Fusarium graminearum* Schw [Chinese] (abstract). *Acta Phytopathologica Sinica*, 26(1), 25-28.
- Codex Alimentarius Commission, 2001. Report of the 33rd session of the codex alimentarius committee on food additives and contaminants - ALINORM 01/12A. FAO/WHO, The Hague, 1-300.
- Codex Alimentarius Commission, 2003. Report of the 35rd session of the codex alimentarius committee on food additives and contaminants. Discussion paper on deoxynivalenol - CX/FAC 03/35. FAO/WHO, Arusha, Tanzania, 1-12.
- Coic Y., 1956. La nutrition et la fertilisation azotées du blé d'hiver - I. Les besoins en azote du blé d'hiver, conséquences agronomiques. *Annales Agronomiques*, 1, 115-131.
- Colbach N., 1995. Thèse - Modélisation de l'influence des systèmes de culture sur les maladies du pied et des racines du blé tendre d'hiver, INA P-G, Paris, 1-258+annexes.
- Commission des Communautés Européennes, 1998. Commission directive 98/53/EC of the 16 July 1998 on laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal*, 201, 93-101.

- Commission des Communautés Européennes, 2002. Commission directive 2002/27/EC of the 13 March 2002 amending Directive 98/83/EC on laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal*, 75, 44-45.
- Cromey M. G., Shorter S. C., Lauren D. R., and Sinclair K. I., 2002. Cultivar and crop management influences on fusarium head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(4), 235-247.
- Daamen R. A., Langerak C. J., and Stol W., 1991. Surveys of cereal diseases and pests in The Netherlands. III- *Monographella nivalis* and *Fusarium* spp. in winter wheat fields and seed lots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 97, 105-114.
- Dalbiès-Dulout A., 1999. Thèse - Contribution au diagnostic et à la prévision des effets précédents du gel des terres annuels, INA P-G, 1-139.
- David C., 2004. Thèse - Le blé en agriculture biologique - Diagnostic agronomique et raisonnement de la fertilisation azotée de printemps, INA P-G, Paris, 1-122.
- De Wolf E. D., Madden L. V., and Lipps P. E., 2003. Risk assessment models for wheat *Fusarium* head blight epidemics based on within-season weather data. *Phytopathology*, 93(4), 428-435.
- Demotes-Mainard S., and Jeuffroy M. H., 2001. Incorporating radiation and nitrogen nutrition into a model of kernel number in wheat. *Crop Science*, 41(2), 415-423.
- Desjardins A. E., Proctor R. H., Bai G., McCormick S. P., Shaner G., Buechley G., and Hohn T. M., 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(9), 775-781.
- Detrixhe P., Chandelier A., Cavelier M., Buffet D., and Oger R., 2003. Development of an agrometeorological model integrating leaf wetness duration estimation to assess the risk of head blight infection in wheat. *Aspects of Applied Biology*, 68, 199-204.
- Dill-Macky R., and Jones R. K., 2000. The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease*, 84, 71-76.
- Diouf M., 1990. Thèse - Analyse de l'élaboration du rendement du mil (*Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb.) - Mise au point d'une méthode de diagnostic en parcelles paysannes, INA P-G, Paris, 1-227.
- Direction Générale de l'Alimentation, 2002. Résultats des plans de surveillance 2000 et 2001, de la contamination des céréales françaises par certaines mycotoxines, Paris, 1-15.
- Doré T., 1992. Thèse - Analyse par voie d'enquête, de la variabilité des rendements et des effets précédents du pois protéagineux de printemps (*Pisum sativum* L.), INA P-G, 1-214.
- Doré T., Le Bail M., and Verger P., 2002. Pratiques agricoles et sécurité sanitaire des aliments en production végétale. *Cahiers Agricultures*, 11(13), 177-185.
- Doré T., Sebillotte M., and Meynard J. M., 1997. A diagnostic method for assessing regional variations in crop yield. *Agricultural Systems*, 54(2), 169-188.
- draf.ile-de-france, 2004. <http://draf.ile-de-france.agriculture.gouv.fr/srsa/chiffres.htm>. source Agreste SAP 2001.
- Edwards S. G., Pirgozliev S. R., Hare M. C., and Jenkinson P., 2001. Quantification of Trichothecene-Producing *Fusarium* Species in Harvested Grain by Competitive PCR To Determine Efficacies of Fungicides against *Fusarium* Head Blight of Winter Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1575-1580.
- Engler K. H., Coker R. D., and Evans I. H., 1999. A colorimetric technique for detecting trichothecenes and assessing relative potencies. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1854-1857.
- Eudes F., 1998. Thèse - Etude de l'impact des trichothécènes de *Fusarium* chez le blé et sélection in vitro pour la résistance à la fusariose de l'épi, Université de Laval Québec, 1-83+annexes.
- Eudes F., Collin J., Rioux S., and Comeau A., 1997. The trichothecenes, a major component of wheat scab pathogenesis. *Cereal Research Communications*, 25, 495-496.
- Eudes F., Comeau A., Rioux S., and Collin J., 2000. Phytotoxicité de huit mycotoxines associées à la fusariose de l'épi chez le blé. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 286-292.
- Eudes F., Comeau A., Rioux S., and Collin J., 2001. Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight (*Fusarium graminearum*) development in spring wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23, 318-322.

- European Commission, 2002. Opinion of the scientific committee on food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, No. SCF/CS/CNTM/MYC/27 final. European Commission - Health and consumer protection directorate general, Brussel, Belgium, 1-12.
- Fauzi M. T., and Paulitz T. C., 1994. The effect of plant growth regulators and nitrogen on *Fusarium* head blight of the spring wheat cultivar max. *Plant Disease*, 78, 289-292.
- Feekes W., 1941. De tarwe en haar milieu (Wheat and its environment). In Vers. XVII Techn. Tarwe Comm., Groningen, Netherland, 560-561.
- Fischer R. A., 1985. Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *J. Agric. Sci. Camb.*, 105, 447-461.
- Food and Agriculture Organization, 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995- A compendium (abstract). FAO Food and Nutrition, Rome, 1-64.
- Fourbet J. F., Malmauret L., Doré T., and Verger P., 2001. Impact du mode de conduite des cultures sur la qualité agronomique et toxicologique du blé. Application à l'agriculture biologique, No. 99-36, Convention MAP/INRA, 1-16 + annexes.
- Galtier P., Comera C., Oswald I., and Puel O., 2000. Mycotoxines: origines et toxicités. In 6<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, France. (Association Française de Protection des Plantes, ed.), Vol. 1, 77-86.
- Gang G., Miedaner T., Schuhmacher U., Schollenberger M., and Geiger H. H., 1998. Deoxynivalenol and nivalenol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology*, 88(9), 879-884.
- Gate P., 1995. Ecophysiology of wheat. De la plante à la culture, (ITCF, ed.), Tec et Doc, Paris, 1-429.
- Gilbert J., and Tekauz A., 2000. Review: Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 1-8.
- GIPSA, 1999. Grain fungal diseases and mycotoxin reference. GIPSA, Technical Services Division, Kansas City, 1-54.
- Gish W., and States D. J., 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.*, 3, 266-272.
- Grosjean F., Leuillet M., Berhaut P., and Niquet G., 2002. Nettoyage, stockage et gestion des lots - la prévention est payante. *Perspectives Agricoles*, 278, 40-41.
- Hart L. P., 1998. Variability of vomitoxin in truckloads of wheat in a wheat scab epidemic year. *Plant Disease*, 82(6), 625-630.
- Hart L. P., Pestka J. J., and Liu M. T., 1984. Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 74, 1415-1418.
- Hart P., and Schabenberger O., 1999. How to sample wheat to accurately determine vomitoxin levels. <http://www.msue.msu.edu/imp/modab/26309701.htm>.
- Hestbjerg H., Elmholt S., Nielsen K. F., and Felding G., 2000. The ecology of toxin producing fungi (abstract). In 17th Danish Plant Protection Conference II, Site-specific crop protection, decision support, pests and diseases, ear blight, Denmark.
- Hestbjerg H., Felding G., and Elmholt S., 2002. *Fusarium culmorum* infection of barley seedlings: correlation between aggressiveness and deoxynivalenol content. *Journal of Phytopathology*, 150, 308-312.
- Higgins D. G., and Sharp P. M., 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73, 237-244.
- Higgins D. G., and Sharp P. M., 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS*, 5, 151-153.
- Homdork S., Fehrmann H., and Beck R., 2000. Effects of field application of tebuconazole on yield, yield components and the mycotoxin content of *Fusarium*-infected wheat grain. *Journal of Phytopathology*, 148, 1-6.
- Hooker D. C., and Schaafsma A. W., 2003. The DONcast model: using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Aspects of Applied Biology*, 68, 117-122.

- Hooker D. C., Schaafsma A. W., and Tamburic-Ilincic L., 2002. Using weather variables pre- and post-heading to predict deoxynivalenol content in winter wheat. *Plant Disease*, 86(6), 611-619.
- Horsfall J. G., and Dimond A. E., 1957. Interactions of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten*, 64(7-10), 415-421.
- IARC, 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (IARC, ed.), Lyon, Vol. 56.
- Ios R., 2001. Les *Fusarium* et *Microdochium* sur grains de céréales en France. *Phytoma*, 539, 52-55.
- Ios R., and Bakan B., 2000. Study of the *Fusarium* spp. from cereal grains and their related mycotoxins. In 6<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, France. (Association Française de Protection des Plantes, ed.), Vol. 1, 427-434.
- Ios R., and Faure A., 2001. Fusariose des épis, mycotoxines et traitements fongicides. *Phytoma*, 539, 56-63.
- ITAB, 2000. Agriculture biologique et mycotoxines: pour en finir avec les idées reçues. *Alter Agri*, 44, 8-12.
- JECFA, 2000. Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO Technical Report Series 896. World Health Organization, Geneva, 1-136.
- Jeger M. J., 2000. Bottlenecks in IPM. *Crop Protection*, 19, 787-792.
- Jenkinson P., and Parry D. W., 1994a. Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycological Research*, 98, 506-510.
- Jennings P., Coates M., Turner J. A., and Nicholson P., 2003. Distribution of deoxynivalenol/nivalenol producing isolates of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in England and Wales (abstract). *Aspects of Applied Biology*, 68, 43-48.
- Jeuffroy M. H., and Bouchard C., 1999. Intensity and duration of nitrogen deficiency on wheat grain number. *Crop Science*, 39, 1385-1393.
- Jin Y. Z., and Yoshizawa T., 1994. Relationship between the incidence of mycotoxigenic *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) in crop fields and the occurrence of trichothecenes in wheat [Japanese] (abstract). *Mycotoxins*, 40(17), 39-42.
- Justes E., Mary B., Meynard J. M., Machet J. M., and Thelier-Huche L., 1994. Determination of a critical dilution curve for winter wheat crops. *Annals of Botany*, 74, 397-407.
- Laboratoire National de la Protection des Végétaux, 2002. Détection et identification des espèces de *Fusarium* spp. et *Microdochium nivale* sur grains de céréales par isolement mycologique semi sélectif et étude microbiologique - Méthode MH-02-16, Malzeville.
- Lacey J., Bateman G. L., and Mirocha C. J., 1999. Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat. *Annals of Applied Biology*, 134(3), 277-283.
- Langseth W., Hoie R., and Gullord M., 1995. The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination of Norwegian oats 1985-1990. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 45, 63-67.
- Le Bail M., 1997. Thèse - Maîtrise de la qualité des céréales à l'échelle du bassin d'approvisionnement d'une entreprise de collecte-stockage. Approche agronomique, INA P-G, Paris, 1-237+annexes.
- Le Boulc'h V., Bedouret S., Poyet V., Barchietto T., Hazouard D., De Paepe I., and Seng J. M., 2000. Un test innovant pour contrôler la qualité sanitaire des céréales: détection des champignons potentiellement producteurs d'une famille de mycotoxines, les trichothécènes. In 6<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, France. (Association Française de Protection des Plantes, ed.), Vol. 1, 451-458.
- Le Boulc'h V., Bédouret S., Poyet V., Barchietto T., Pfohl-Leszkowicz A., and Seng J. M., 2000. Evaluation de la qualité sanitaire du blé. A propos des mycotoxines et des moyens de les détecter. *Phytoma*, 530, 21-26.
- Lori G. A., Carranza M. R., Violante A., Rizzo I., and Alippi H. E., 1992. *Fusarium* spp. en trigo, capacidad toxicogenica y quimiotaxonomia de las cepas aisladas en la Argentina. *Agronomie*, 12(6), 459-467.

- Madden T. L., Tatusov R. L., and Zhang J., 1996. Applications of network BLAST server. *Meth. Enzymol.*, 266, 131-141.
- Magan N., Hope R., Colleate A., and Baxter E. S., 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 685-690.
- Malmauret-Rossignol L., 2002. Thèse - Mise en évidence de trois groupes de consommateurs à risque vis-à-vis de divers contaminants présents dans l'alimentation, INA P-G, 1-166.
- Malmauret L., Parent-Massin D., Hardy J. L., and Verger P., 2002. Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 524-532.
- Marin S., Magan N., Serra J., Ramos A. J., Canela R., and Sanchis V., 1999. Fumonisin B<sub>1</sub> production and growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize, wheat, and barley grain. *Journal of Food Science*, 64(5), 921-924.
- Masle-Meynard J., 1980. Thèse - L'élaboration du nombre d'épis chez le blé d'hiver. Influence de différentes caractéristiques de la structure du peuplement sur l'utilisation de l'azote et de la lumière, INA P-G, 1-273.
- Maumené C., Caron D., Genette S., and Maufras J., 2000. Des fongicides pour réduire les grains fusariés. *Perspectives Agricoles*, 274bis, 6-7.
- Maumené C., Caron D., Genette S., and Maufras J. Y., 2001. Des fongicides pour réduire les grains fusariés. *Perspectives Agricoles*, 274bis, 6-7.
- Maumené C., Leuillet M., Caron D., and Henriot F., 2000. Incidence des fongicides et de la variété sur le risque de contamination du blé tendre par le déoxynivalénol (DON) en France: premiers résultats. In 6<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes, Tours, France. (Association Française de Protection des Plantes, ed.), Vol. 1, 459-466.
- McMullen M., Jones R., and Gallenberg D., 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81, 1340-1348.
- Messiaen C. M., 1957. Richesse en sucre des tiges de maïs et verse parasitaire. *Revue de Pathologie Végétale et d'Entomologie Agricole de France*, 36(4), 209-213.
- Mesterhazy A., 1983. Breeding wheat for resistance to *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Z. Pflanzenzüchtg - Plant Breeding*, 91, 295-311.
- Mesterhazy A., 1995. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding*, 114, 377-386.
- Mesterhazy A., 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 675-684.
- Mesterhazy A., and Bartok T., 1996. Control of *Fusarium* head blight of wheat by fungicides and its effect on the toxin contamination of the grains. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 49(2), 181-198.
- Mesterhazy A., and Rowaished A. K., 1977. Analysis of symptoms caused by *Fusarium graminearum* Schwabe and its relation to powdery mildew infection in wheat. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 12(3-4), 289-301.
- Meynard J. M., 1987. L'analyse de l'élaboration du rendement sur les essais de fertilisation azotée. *Perspectives Agricoles*, 115, 76-83.
- Meynard J. M., and David G., 1992. Diagnostic de l'élaboration du rendement des cultures. *Cahiers Agricultures*, 1, 9-19.
- Meynard J. M., Doré T., and Habib R., 2001. L'évaluation et la conception de systèmes de culture pour une agriculture durable. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 87(4), 223-236.
- Meynard J. M., Reau R., Robert D., and Daulas P., 1996. Evaluation expérimentale des itinéraires techniques. Comité potentialités - ACTA-Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation (DERF), 1-63-72.
- Midmore D. J., Cartwright P. M., and Fischer R. A., 1984. Wheat in tropical environments. II- Crop growth and grain yield. *Field Crops Research*, 8, 207-227.
- Miedaner T., and Reinbrecht C., 2001. Trichothecene content of rye and wheat genotypes inoculated with a deoxynivalenol- and a nivalenol-producing isolate of *Fusarium culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 149(5), 245-251.

- Miedaner T., Reinbrecht C., and Schilling A. G., 1999. Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz - Journal of Plant Disease and Protection*, 107(2), 124-134.
- Miller J. D., Greenhalgh R., Wang Y., and Lu M., 1991. Trichothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia*, 83(2), 121-130.
- Miller J. D., and Young J. C., 1985b. Deoxynivalenol in an experimental *Fusarium graminearum* infection of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7, 132-134.
- Miller J. D., Young J. C., and Trenholm H. L., 1983. *Fusarium* toxins in field corn. I- Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany*, 61, 3080-3087.
- Mirocha C. J., Abbas H. K., Windels C. E., and Xie W., 1989. Variation in deoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone production by *Fusarium graminearum* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5), 1315-1316.
- Monaghan S., van Maanen A., Leonard G., Brennan J. M., Doohan F. M., and Cooke B. M., 2004. Disease epidemiology of *Fusarium* head blight in Ireland: influence of climatic factors on the incidence of FHB and mycotoxin in wheat during 2001 and 2002. In VIII ESA Congress: European Agriculture in a Global Context, Copenhagen, Denmark. (S. E. Jacobsen, C. R. Jensen and J. R. Porter, eds.), 139-140.
- Muthomi J. W., Schütze A., Dehne H. W., Mutitu E. W., and Oerke E. C., 2000. Characterization of *Fusarium culmorum* isolates by mycotoxin production and aggressiveness to winter wheat. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz - Journal of Plant Disease and Protection*, 107(2), 113-123.
- Nelson P. E., Toussoun T. A., and Marasas W. F. O., 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification, The Pennsylvania State University Press, University Park Londres, 1-193.
- Nicholson P., Chandler E., Draeger R. C., Gosman N. E., Simpson D. R., Thomsett M., and Wilson A. H., 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of *Fusarium* head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 691-703.
- Niessen M. L., and Vogel R. F., 1998. Group specific PCR-detection of potential trichothecene-producing *Fusarium* species in pure cultures and cereal samples. *Systematic and Applied Microbiology*, 21, 618-631.
- Nirenberg H. I., 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1599-1609.
- O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E., and Ploetz R. C., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(5), 2044-2049.
- O'Donnell K., Kistler H. C., Tacke B. K., and Casper H. H., 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(14), 7905-7910.
- Office of Technology Assessment U.S. Congress, 1990. A plague of locusts, Special Report, OTA-F-450. Cited by Jeger, 2000. U.S. Government Printing Office, Washington DC.
- ONIC, 2003. Collecte des céréales bio campagne 2002-2003, 1-4.
- Onuorah P. E., 1969. Effect of mineral nutrition on the *Fusarium* Brown foot-rot of wheat. *Plant and Soil*, (1), 99-104.
- organic-europe, 2004. [http://www.organic-europe.net/country\\_reports/france/agence-bio-2002-donnees-generales.pdf](http://www.organic-europe.net/country_reports/france/agence-bio-2002-donnees-generales.pdf).
- Parry D. W., Jenkinson P., and McLeod L., 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology*, 44, 207-238.
- Perkowski J., Pavlova A., Srobarova A., Stachowiak J., and Golinski P., 2002. Group B trichothecenes biosynthesis in wheat cultivars after heads inoculation with *Fusarium culmorum* isolates (abstract). *Biologia*, 57(6), 765-771.
- Perrière G., and Gouy M., 1996. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, 78, 364-369.
- Pettersson H., and Aberg L., 2003. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control*, 14, 229-232.

- Placinta C. M., D'Mello J. P. F., and Macdonald A. M. C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21-37.
- Proctor R. H., Desjardins A. E., McCormick S. P., Plattner R. D., Alexander N. J., and Brown D. W., 2002. Genetic analysis of the role of trichothecene and fumonisin mycotoxins in the virulence of *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 691-698.
- Pugh G. W., Johann H., and Dickson J. G., 1933. Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural Research*, 46, 771-797.
- Quillien J. F., 2002. Les mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - Centre de Réseaux pour l'Innovation en Agriculture et Agroalimentaire (CRIAA), Paris, France, 1-24.
- Raimbault J. M., Orlando D., Grosjean F., and Leuillet M., 2002. Méthodes d'échantillonnage et de quantification des mycotoxines - Réussir à trouver des aiguilles dans une meule de foin. *Perspectives Agricoles*, 278, 32-35.
- Rodgers-Gray B. S., and Shaw M. W., 2000. Substantial reductions in winter wheat diseases caused by addition of straw but not manure to soil. *Plant Pathology*, 49, 590-599.
- Rudd J. C., Horsley R. D., McKendry A. L., and Elias E. M., 2001. Host plant resistance genes for fusarium head blight: sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems. *Crop Science*, 41(3), 620-627.
- Savard M. E., Sinha R. C., Seaman W. L., and Fedak G., 2000. Sequential distribution of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat spikes after inoculation with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22, 280-285.
- Savary S., Elazegui F. A., Moody K., Litsinger J. A., and Teng P. S., 1994. Characterization of rice cropping practices and multiple pest systems in the Philippines. *Agricultural Systems*, 46(4), 385-408.
- Scientific Cooperation (SCOOP), 2003. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States, No. Task 3.2.10. Directorate-General Health and Consumer Protection, 1-606.
- Sebillotte M., 1978a. Itinéraires techniques et évolution de la pensée agronomique. *Compte Rendu de l'Académie d'Agriculture de France*, 11, 906-913.
- Sebillotte M., 1990. Système de culture, un concept opératoire pour les agronomes. In Les systèmes de culture (Combe and Picard, eds.) INRA, Paris, 165-196.
- ShouXi C., and Kleijer G., 2001. Effects of *Fusarium* metabolites on growth of callus and seedling in triticale (abstract). *Acta Prataculturae Sinica*, 10(1), 78-85.
- Simpson D. R., Weston G. E., Turner J. A., Jennings P., and Nicholson P., 2001. Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 421-431.
- Snijders C. H. A., 1990b. *Fusarium* head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 96, 187-198.
- Snijders C. H. A., and Krechting C. F., 1992. Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat. *Canadian Journal of Botany*, 70, 1570-1576.
- Snijders C. H. A., and Perkowski J., 1990e. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology*, 80, 566-570.
- Spiertz J. H. J., 1977. The influence of temperature and light intensity on grain growth in relation to the carbohydrate and nitrogen economy of the wheat plant. *Netherlands Journal of Agric. Sci.*, 25, 182-197.
- Strange R. N., and Smith H., 1971. A fungal growth stimulant in anthers which predisposes wheat to attack by *Fusarium graminearum*. *Physiological Plant Pathology*, 1, 141-150.
- Sugiura Y., Watanabe Y., Tanaka T., Yamamoto S., and Ueno Y., 1990. Occurrence of *Gibberella zeae* strains that produce both nivalenol and deoxynivalenol. Cited by Muthomi et al. 2000. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3044-3051.
- Sutton J. C., 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 195-209.

- Teich A. H., 1989. Epidemiology of wheat (*Triticum aestivum* L.) scab caused by *Fusarium* spp. In *Fusarium: mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* (J. Chelkowski, ed.) Elsevier, Amsterdam (NLD), Vol. 2 - Chapter 16, 269-282.
- Teich A. H., and Hamilton J. R., 1985. Effect of cultural practices, soil phosphorus, potassium, and pH on the incidence of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol levels in wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1429-1431.
- Teich A. H., and Nelson K., 1984. Survey of *Fusarium* head blight and possible effects of cultural practices in wheat fields in Lambton County in 1983. *Canadian Plant Disease Survey*, 64(1), 11-13.
- Teich A. H., Shugar L., and Smid A., 1987. Soft white winter wheat cultivar field-resistance to scab and deoxynivalenol accumulation. *Cereal Research Communications*, 15, 109-114.
- Ternois N., and Hervé A., 2000. Aflatoxine et ochratoxine A: des risques sanitaires. *Cultivar*, 482, p XX.
- Thouvenot D., 2002. Moisissure et mycotoxine. In *Mycotoxines: un prochain enjeu de sécurité alimentaire?* (CERAAF, ed.) Les cahiers de recherche, N°2, Blois, France, 14-17.
- Trolldenier K., 1969. Maladie des céréales et nutrition des plantes. *Revue de la Potasse*, section 23, 1-16.
- Tsuda S., Kosaka Y., Murakami M., Matsuo H., Matsusaka N., Taniguchi K., and Sasaki Y. F., 1998. Detection of nivalenol genotoxicity in cultured cells and multiple mouse organs by the alkaline single-cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415(3), 191-200.
- Ulrich A., 1952. Physiological bases for assessing the nutritional requirements of plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 3, 207-228.
- universcereales, 2004. [http://www.universcereales.com/fr/collective/cereales\\_az.asp](http://www.universcereales.com/fr/collective/cereales_az.asp). Vol. 2004.
- Van Keer K., 2003. Thesis -On-farm agronomic diagnosis of transitional upland rice swidden cropping systems in northern Thailand, Université de Leuven, Belgique, 1-220.
- Vidal D. R., 1990. Propriétés immunosuppressives des mycotoxines du groupe des trichothécènes. *Bulletin de l'institut Pasteur*, 88, 159-192.
- Walker S. L., Leath S., Hagler W. M., and Murphy J. P., 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with *Fusarium* head blight in north Carolina. *Plant Disease*, 85(4), 404-410.
- Wang Y. Z., and Miller J. D., 1988. Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. *Journal of Phytopathology*, 122, 118-125.
- Weidner S., Arnold W., and Puhler A., 1996. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 766-771.
- Whitaker T. B., 2003. Standardisation of mycotoxin sampling procedures: an urgent necessity. *Food Control*, 14(4), 233-237.
- Whitaker T. B., Hagler W. M., Jr., Giesbrecht F. G., and Johansson A. S., 2000. Sampling, sample preparation, and analytical variability associated with testing wheat for deoxynivalenol (abstract). *Journal of AOAC International*, 83(5), 1285-1292.
- Whitaker T. B., and Wiser E. H., 1969. Theoretical investigations into the accuracy of sampling shelled peanuts for aflatoxin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 46, 377-379.
- White T. J., Bruns T., Lee S., and Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Chapter 38. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White, eds.) Academic Press, Orlando, Florida.
- Young E., 2001. Fusariose de l'épi sur blé tendre. Le précédent et le travail du sol sont déterminants. *Cultivar*, 506, 38-41.
- Zhang J., and Madden T. L., 1997. PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.*, 7, 649-656.



## Annexe 1 : Caractéristiques générales des variétés présentes dans les dispositifs

D'après le Mémento des Semences, 2001<sup>b</sup>

Variété	Précocité <sup>a</sup>		Epiaison		Hauteur <sup>a</sup>		Sensibilité <sup>a</sup> à la fusariose des épis	
	Montaison							
<i>Apache</i>			7/9	Précoce	3.5/9	Assez courte	5/9	Assez sensible à peu sensible
<i>Isengrain</i>	3/9	Tardive / demi-tardive	5,5/9	Demi-précoce	3/9	Courte	3/9	Sensible à assez sensible
<i>Malacca</i>			6/9		3,5/9			
<i>Camp Remy</i>							5/9	Assez sensible à peu sensible
<i>Aristos</i>	non déterminé		5/9	Demi-tardive à demi-précoce	6/9	Moyen à haut		à peu sensible
<i>Païndor</i>					2,5		4/9	Assez sensible
<i>Virtuose</i>	1/9	Très tardive			3/9	Très courte à courte	6/9	Peu sensible
<i>Charger</i>			6/9	Demi-précoce	2,5/9		2/9	Sensible
<i>Renan</i>					3.5/9		6/9	Peu sensible

C'est la référence actuelle de résistance (Anonyme, 2000)

<sup>a</sup> Les caractéristiques variétales (précocité, hauteur et sensibilité aux maladies) variété sont classées sur des échelles allant de 1 à 9. <sup>b</sup> *Somme* n'est pas une variété assez cultivée pour apparaître dans ce classement.

## Annexe 2 : Analyse chimique des sols des parcelles suivies en 2001-02 et 2002-03

(a) Année 2001-02

Année	Parcelles	% Argile	% Sable	MO g/kg	N-NO3 kg/ha	N-NH4 kg/ha	Nmin kg/ha	Ntotal <sup>a</sup> g/kg	Rapport Corg/N	pH eau	Calcaire g/kg	Phosphore <sup>b</sup> g/kg	Potassium g/kg	Magnésium g/kg	Silicium <sup>c</sup> g/kg
2001-02	AI	22%	10%	20,90	37,97	9,42	47,39	1,32	9,2	6,9	1	0,13	0,34	0,13	0,016
	AII	22%	10%	21,71	103,23	8,86	112,10	1,40	9,0	7,8	2	0,24	0,34	0,18	0,014
	AIII	19%	22%	23,09	30,58	9,15	39,73	1,39	9,7	7,6	3	0,26	0,28	0,14	0,015
	BI	21%	11%	18,87	21,86	17,07	38,93	1,26	8,7	7,8	3	0,12	0,22	0,10	0,012
	BII	29%	18%	51,81	28,41	17,45	45,86	3,37	8,9	8,1	164	0,13	0,27	0,32	0,009
	BIII	15%	11%	14,73	38,23	23,03	61,26	0,96	8,9	6,7	1	0,07	0,18	0,08	0,010
	BIV	29%	10%	24,08	86,04	30,23	116,27	1,65	8,5	8,2	47	0,17	0,36	0,19	0,013
	CI	9%	79%	37,91	25,78	10,13	35,91	1,11	19,8	8,2	49	0,54	0,25	0,16	0,012
	CII	14%	65%	36,34	27,78	8,69	36,46	1,06	20,0	8,2	32	0,90	0,31	0,16	0,016
	CIII	18%	20%	20,16	64,51	6,58	71,09	1,15	10,2	8,0	6	0,39	0,33	0,19	0,017
	CIV	16%	23%	18,42	29,14	7,34	36,48	1,10	9,7	7,8	3	0,31	0,34	0,21	0,015
	DI	26%	7%	19,05	45,47	7,95	53,42	1,26	8,8	8,2	12	0,19	0,21	0,11	0,015
	DII	25%	7%	17,57	111,09	7,39	118,48	1,18	8,6	8,2	15	0,18	0,22	0,11	0,014
	DIII	23%	7%	17,13	84,76	4,20	88,97	1,15	8,7	7,6	2	0,16	0,25	0,12	0,013
	DIV	31%	7%	23,32	120,10	5,05	125,15	1,51	9,0	8,2	31	0,15	0,59	0,15	0,014
	EI	17%	16%	12,89	9,05	8,57	17,63	0,81	9,3	6,7	1	0,16	0,26	0,14	0,013
	EII	21%	17%	14,77	62,56	7,21	69,77	0,95	9,0	5,7	1	0,12	0,23	0,16	0,013
	Productif	17%	22%	16,38	4,53	2,32	6,85	0,93	10,3	7,4	1	0,36	0,30	0,28	0,015
	Intégré	16%	25%	16,63	14,51	1,96	16,47	0,99	9,9	7,2	1	0,35	0,30	0,20	0,015
	Sans Wsol	16%	33%	18,93	6,51	3,96	10,47	1,13	9,8	7,3	1	0,44	0,31	0,24	0,015
Biologique	17%	23%	15,14	22,51	1,89	24,40	0,92	9,6	7,5	1	0,32	0,25	0,24	0,014	

Toutes les parcelles commençant par la même lettre sont cultivées par un même agriculteur. Les quatre dernières parcelles, nommées : Productif, Intégré, Sans travail du sol avec couverture permanente (Sans Wsol), et Biologique, correspondent aux différents systèmes de culture dans l'essai systèmes de longue durée de Versailles.

<sup>a</sup> Dosage de l'azote selon la méthode de Dumas, <sup>b</sup> Dosage du phosphore selon la méthode Joret Hebert, <sup>c</sup> Dosage du silicium selon la méthode Mehra-Jackson

## (b) Année 2002-03

Année	Parcelles	% Argile	% Sable	MO g/kg	N-NO3 kg/ha	N-NH4 kg/ha	Nmin kg/ha	Ntotal <sup>a</sup> g/kg	Rapport Corg/N	pH eau	Calcaire g/kg	Phosphore <sup>b</sup> g/kg	Potassium g/kg	Magnésium g/kg	Silicium <sup>c</sup> g/kg
2002-03	AIV	15%	21%	19,05	12,44	6,55	36,98	1,09	10,2	8,0	4	0,36	0,25	0,09	0,010
	BV	26%	9%	31,72	11,70	4,87	32,14	1,90	9,7	8,1	49	0,07	0,29	0,13	0,011
	BVI	27%	8%	28,92	14,52	3,84	35,71	1,76	9,6	8,1	34	0,05	0,26	0,13	0,011
	BVII	21%	10%	29,31	21,96	4,08	51,07	1,81	9,4	8,0	12	0,12	0,30	0,12	0,012
	BVIII	30%	9%	20,52	12,92	6,38	37,60	1,39	8,6	8,2	33	0,08	0,33	0,17	0,013
	CV	20%	26%	22,93	24,59	4,79	57,77	0,92	14,4	8,4	183	0,50	0,32	0,16	0,018
	CVI	22%	32%	25,76	14,60	1,60	31,40	1,12	13,3	8,3	58	0,70	0,38	0,21	0,018
	DV	30%	12%	27,75	38,28	8,15	91,85	1,69	9,6	8,2	161	0,16	0,38	0,10	0,011
	DVI	40%	18%	43,21	48,36	9,18	114,08	2,48	10,1	8,3	489	0,28	1,40	0,16	0,002
	EIII	18%	12%	15,69	11,70	5,99	34,38	0,93	9,8	7,2	1	0,13	0,19	0,12	0,013
	EIV	18%	12%	15,69	11,70	5,99	34,38	0,93	9,8	7,2	1	0,13	0,19	0,12	0,013
	EV	20%	21%	16,96	18,61	7,75	51,71	1,00	9,9	6,9	1	0,07	0,20	0,20	0,012
	EVI	5%	85%	8,00	3,03	2,95	10,96	0,38	12,2	6,1	1	0,16	0,09	0,07	0,008
	Productif	17%	22%	18,03	6,09	3,80	18,76	1,04	10,1	7,4	2	0,30	0,27	0,22	0,017
	Intégré	15%	29%	18,83	17,24	3,87	41,23	1,11	9,9	7,2	1,5	0,33	0,26	0,20	0,019
	Sans Wsol	16%	27%	17,93	9,64	5,63	29,54	1,03	10,2	7,3	1	0,35	0,26	0,27	0,017
Biologique	16%	21%	15,00	12,51	5,05	34,12	0,88	9,9	7,3	1	0,31	0,25	0,21	0,015	

Toutes les parcelles commençant par la même lettre sont cultivées par un même agriculteur. Les quatre dernières parcelles, nommées : Productif, Intégré, Sans travail du sol avec couverture permanente (Sans Wsol), et Biologique, correspondent aux différents systèmes de culture dans l'essai systèmes de longue durée de Versailles.

<sup>a</sup> Dosage de l'azote selon la méthode de Dumas, <sup>b</sup> Dosage du phosphore selon la méthode Joret Hebert, <sup>c</sup> Dosage du silicium selon la méthode Mehra-Jackson



### Annexe 3 : Effets de différentes doses d'apports azotés sur la contamination en mycotoxines des grains

Site de l'essai	Dose d'azote apportée sous forme de fiente de poule à 3,98% d'azote	Teneur en protéines des grains	Rendement, q/ha (à 15% d'humidité)	Teneur des grains en déoxynivalénol, µg/kg	Teneur des grains en nivalénol, µg/kg
Exploitation B, 2001-02	0 N	12%	63	60	<d <sub>l</sub>
	40 N	12%	68	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	80N Date précoce	12%	71	80	<d <sub>l</sub>
	120 N	13%	74	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	160 N	14%	77	80	<d <sub>l</sub>
	80 N Date tardive	13%	69	<d <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	80+40	13%	74	80	<d <sub>l</sub>
Exploitation B, 2002-03	ON	11%	27	70	<d <sub>l</sub>
	53N	11%	30	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
	106N	11%	33	100	<d <sub>l</sub>
	159N	12%	37	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
	213N	12%	38	60	<d <sub>l</sub>
	106+53N	12%	34	130	<d <sub>l</sub>
Exploitation D, 2002-03 en sur-fumure	ON	15%	64	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
	53N	15%	65	90	<d <sub>l</sub>
	106N	15%	65	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
	159N	15%	64	<q <sub>l</sub>	<d <sub>l</sub>
	213N	15%	65	<q <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>
	106+53N	15%	65	<d <sub>l</sub>	<q <sub>l</sub>

Essai du Groupement des Agriculteurs Biologiques d'Ile de France sur des cultures de blés tendre d'hiver, variété *Renan*.



## **Annexe 4 : Composition des milieux de culture**

D'après le Laboratoire National de la Protection des Végétaux de Nancy, 2002  
et l'UR Mycologie et sécurité des aliments de l'INRA de Bordeaux.

### ***Milieu de culture potato-dextrose-agar (PDA)***

Pour un litre de milieu  
PDA en poudre prêt à l'emploi : 39g  
H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée : 1000 ml

### ***Milieu de culture dichloran-chloramphenicol-peptone-agar (DCPA)***

Pour un litre de milieu  
Peptone bactériologique : 15,0 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1,0 g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : 0,5 g  
Chloramphénicol : 0,2 g  
Dichloran (2-6-dichloro-4-nitroaniline) en solution alcoolique : 1 ml  
(0,2 g de dichloran dans 100 ml d'éthanol)  
Crystal violet en solution aqueuse : 1 ml (agent bactériostatique)  
(50 mg de crystal violet dans 100 ml d'eau distillée)  
Agar : 15,0 g  
H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée : 1000 ml

### ***Milieu de culture "synthetiser-nährstoffärmer-agar" (SNA)***

milieu nutritif de synthèse à base d'Agar

Pour un litre de milieu  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1,0 g  
KNO<sub>3</sub> : 1,0 g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : 0,5 g  
KCl : 0,5 g  
Glucose : 0,2 g  
Saccharose : 0,2 g  
Agar : 20,0 g  
H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée : 1000 ml

### ***Milieu de culture GYEP***

Pour un litre de milieu  
Glucose : 50 g  
Néopeptone : 1 g  
Extrait de levure : 1 g  
H<sub>2</sub>O distillée ou osmosée : 1000 ml



## Annexe 5 : Méthodes de biologie moléculaire

D'après Biotransfer

### ***Extraction d'ADN***

La méthode utilisée est celle mise au point par Edwards *et al.* (2001), légèrement modifiée. Deux à trois implants de chaque isolat sont prélevés et mis dans 105 µl d'une solution à 5% de chelex-charbon actif 100 (Sigma). Puis trois cycles successifs de vortex-Micro-onde sont réalisés, avant l'ajout de 330 µl d'une solution à 1% de chelex-charbon actif. Trois nouveaux cycles sont réalisés, et 1 ml d'une solution à 1% de chelex-charbon actif est encore ajouté. La suspension est centrifugée à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C, et 2.5 à 5 µl de surnageant (contenant l'ADN) sont alors prélevés pour chaque PCR d'identification moléculaire des isolats.

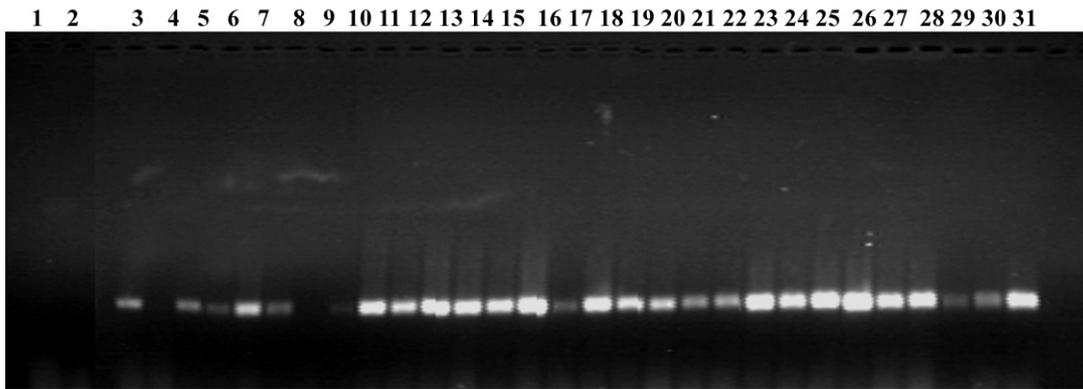
### ***Identification moléculaire des différentes espèces***

Le principe et le protocole de la méthode d'identification des espèces de champignons par PCR à partir des ITS (zones intergeniques d'ADN ribosomal) sont tirés de l'article de White *et al.* (1990). Les amorces utilisées sont ITS1F (cttggctcattacaggaagtaa) et ITS4 (tcctccgcttattgatgac) (mêmes séquences que dans le papier) qui encadrent les séquences ITS1 et ITS2. Le fragment amplifié est de 250 à 750 pb selon les organismes (550 pb environ pour les *Fusarium*). Le mélange réactionnel de PCR (50 µl au final) contient : tampon d'amplification 1X (TrisHCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X100 0,1%, BSA 0,2 mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Q-Biogene), 200 µM dNTP, 0,5 µM de chacune des 2 amorces (ITS1F et ITS4), 1 unité de Taq DNA polymérase (Q-Biogene) et 5 µl d'ADN de chaque échantillon. Le programme PCR utilisé est dérivé du programme décrit dans le papier, avec 35 cycles à une température d'hybridation de 55°C. Un aliquot des échantillons amplifiés est ensuite déposé sur gel d'agarose 1.2% en TBE 1X pour vérifier la qualité de l'amplification puis le reste est envoyé pour séquençage à Millegen, Prologue Biotech (LABEGE, France).

Par la suite, l'identification des séquences est obtenue (i) par soumission des séquences, une à une, au programme BLAST (Altschul *et al.*, 1990 ; Gish and States, 1993 ; Madden *et al.*, 1996 ; Altschul *et al.*, 1997 ; Zhang and Madden, 1997) qui compare chaque séquence à toutes celles présentes dans la base de données GenBank et va renvoyer le ou les noms d'espèce les plus probables ; une évaluation de la pertinence des résultats proposés par BLAST est réalisée par l'intermédiaire du programme et de la base de données développé par National Center for Biotechnology Information (NCBI) ; (ii) par un multi-alignement des séquences avec les séquences caractéristiques de chaque espèce de *Fusarium*, réalisé grâce au logiciel ClustalX, originellement développé par Higgins and Sharp (1988 et 1989) ; et enfin (iii) grâce à un arbre phylogénétique construit à l'aide de ClustalX et visualisé à l'aide du programme NJplot, ce dernier programme ayant été originellement développé par Perrière and Gouy (1996).

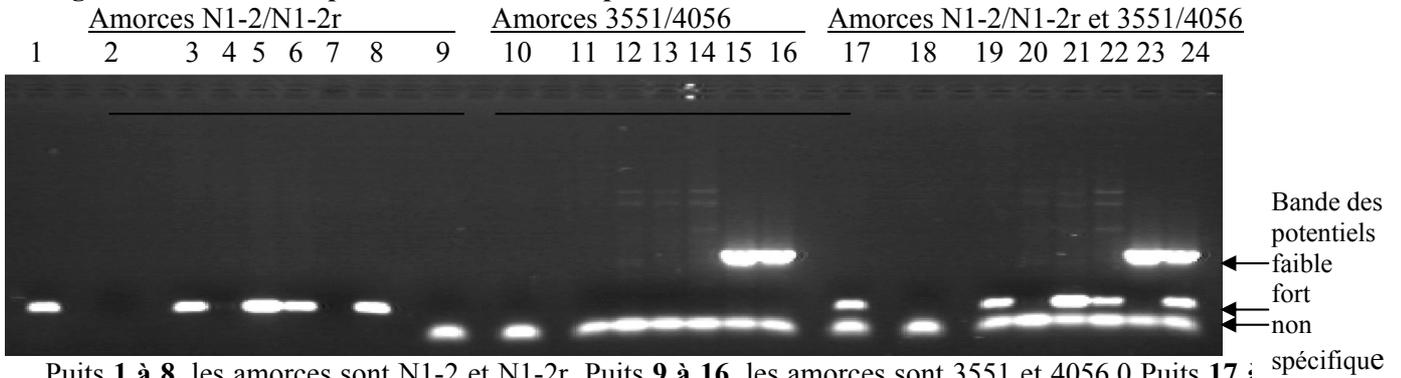
La technique d'identification des différentes espèces de champignons par PCR à partir de leur gène EF1alpha repose, elle, sur deux publications (O'Donnell *et al.*, 1998 ; O'Donnell *et al.*, 2000). Les deux amorces utilisées sont EF1 et EF2 (O'Donnell *et al.*, 2000). Le mélange réactionnel de PCR (50µl au final) contient : tampon d'amplification 1X (TrisHCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X100 0,1%, BSA 0,2 mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Q-Biogene), 200 µM dNTP, 0,5 µM de chacune des 2 amorces (EF1 et EF2), 1 unité de Taq DNA polymérase (Q-Biogene) et 5 µl d'ADN de chaque échantillon. Le programme PCR utilisé est dérivé du programme décrit dans les papiers, avec 35 cycles à une température d'hybridation de 50°C. Comme précédemment pour l'analyse ITS, un aliquot de chaque amplificat est ensuite déposé sur gel d'agarose 1.2% en TBE 1X et de nouveau le reste est envoyé à séquençage à Millegen, Prologue Biotech (LABEGE, France). L'identification des souches se fait ensuite selon le même procédé que dans le cas d'identification à partir des ITS.

**Figure A5-1 : Exemple de la migration des produits d'amplification de la PCR *tri5***



Les puits 1 et 2 contiennent seulement de l'eau. Les puits 4, 9 : correspondent à des échantillons donnant un résultat négatif à cette PCR *tri5*. Les autres puits correspondent à des PCR *tri5* "positives".

**Figure A5-2 : Mise au point de la PCR multiplexe *tri5-tri6***

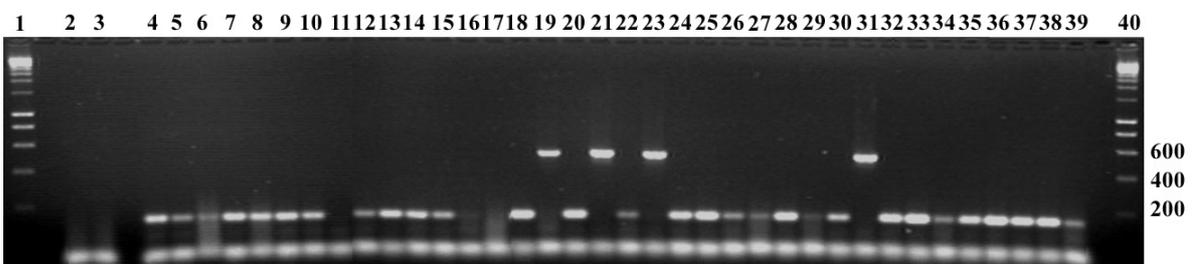


Puits 1 à 8, les amorces sont N1-2 et N1-2r. Puits 9 à 16, les amorces sont 3551 et 4056.0 Puits 17 ; 24, les quatre amorces sont présentes (PCR multiplexe). Puits 1, 9 et 17, S 80 (témoin positif) : souche de *F. culmorum* connue pour produire beaucoup de déoxynivalénol (isolement Biotransfer). Puits 2, 10 et 18, H<sub>2</sub>O (témoin négatif).

Puits 3, 11 et 19, échantillon de la souche de *F. graminearum* Inra A. Puits 4, 12 et 20, échantillon de la souche de *F. graminearum* Inra 91. Puits 5, 13 et 21, échantillon de la souche de *F. graminearum* Inra 95. Puits 6, 14 et 22, échantillon de la souche de *F. graminearum* Inra 39.

Puits 7, 15 et 23 : échantillon de la souche de *F. culmorum* A1 à "faible potentiel de production de déoxynivalénol". Puits 8, 16 et 24 : échantillon de la souche de *F. culmorum* A1 à "faible" +E1 à "forte" potentiel de production de déoxynivalénol.

**Figure A5-3 : Exemple de la migration des produits d'amplification de la PCR *tri5-tri6***



Puits 1 et 40, Etalons de poids moléculaire Smartladder. Puits 2 et 3, H<sub>2</sub>O. Puits 4 à 39, échantillons BT 39 à BT 74, respectivement. Puits 19, 21, 23, et 31, souches dites faiblement productrices de déoxynivalénol. Puits 6, 16, 17, 27 et 29, signaux diffus considérés comme douteux, PCR refaite ultérieurement. Puits 11, PCR *tri5-tri6* négative. Les autres puits, qui montrent des réponses positives, correspondent à des souches réputées fortement productrices de déoxynivalénol.

### ***Technique d'amplification par PCR pour la détection du gène tri5***

Cette technique de PCR est développée à partir de l'article de Niessen and Vogel (1998). De courtes séquences, hautement conservées entre différentes espèces, servent d'amorces pour l'amplification de ce gène (Le Boulc'h *et al.*, 2000a). Les amorces Tox2 et Tox3 permettent l'amplification d'un fragment d'environ 600 pb situé dans le gène *tri5*. Le mélange réactionnel de PCR (25 µl *in fine*) contient : tampon d'amplification 1X (TrisHCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X100 0,1%, BSA 0,2 mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Q-Biogene), 200 µM dNTP, 0,5 µM de chaque amorce Tox2 et Tox3, 1 unité de Taq DNA polymerase (Q-Biogene) et 2.5 µl d'ADN de chaque échantillon. Le programme PCR utilisé est dérivé du programme décrit dans le papier avec 35 cycles à une température d'hybridation de 60°C. Les amplifiats sont ensuite déposés sur gel d'agarose 1.2% en TBE 1X (**Figure A5-1**).

### ***Technique d'amplification par PCR pour la détection d'une région intergénique entre les gènes tri5 et tri6***

La détection de cette région est réalisée selon les travaux de Bakan *et al.*, 2002. Les amorces utilisées N1-2 et N1-2r (décrites dans le papier) donnent un fragment d'environ 200pb et sont spécifiques des souches dites "fortement producteur de déoxynivalénol". Les amorces utilisées 4056 et 3551 donnent un fragment d'environ 650pb et sont spécifiques des souches dites "faiblement productrices de déoxynivalénol". Le mélange réactionnel de PCR (25µl *in fine*) contient : tampon d'amplification 1X (TrisHCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X100 0,1%, BSA 0,2 mg/ml, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Q-Biogene), 200 µM dNTP, 0,5 µM de chacune des amorces (N1-2 et N1-2r, ou bien 4056 et 3551, ou bien les quatres), 1 unité de Taq DNA polymerase (Q-Biogene) et 5 µl d'ADN de chaque échantillon. Le programme PCR utilisé est le programme du papier de Bakan, modifié pour avoir 40 cycles au lieu de 35 cycles avec une température d'hybridation de 55°C. Les échantillons amplifiés sont ensuite déposés sur gel d'agarose 2% en TBE 1X (**Figures A5-2 et A5-3**).



## Annexe 6 : Tableaux de synthèse issue de la présentation orale de la thèse

**Tableau A6-1 :** Résultats du diagnostic agronomique sur les niveaux d'attaque et de contamination

Environnement / Peuplement / Pratiques		Effet sur la maladie	Effet sur les toxines	Hypothèse d'action
Climat		Non observé	Incertain	
Sol	Sableux		↓	Conservation, développement ? Ou Confusion d'effet
Etat nutritionnel	↗ Azote/Fructose	↗	=	Infection ?
	↗ Azote/Potassium	=	↘	Propagation ?
Travail du sol			↓	Conservation ?
Précédent		Non observé		
<b>Interaction Travail du sol * Densité de résidus * Précédent * Etat nutritionnel dans un contexte environnemental donné</b>				

**Tableau A6-2 :** Tableau de synthèse des effets du climat et des pratiques culturales sur les symptômes et la contamination par les mycotoxines fusariennes

	Conservation / Production d'inoculum	Dissémination de l'inoculum	Infection de la plante	Croissance du champignon	Symptômes	Toxines
Climat						
Labour	-	+ ?			-	-
Précédent hôte	+	- ?				
Nutrition minérale			Rapport azote/fructose +	Rapport azote/potassium -	N+ - = N/fruc +	N+ - N/K -
					P- = K=	P K=
Date de semis			+/-		+/-	+/-
Densité de semis					+	
Variété		RI	RI	RI, II	RI, II, III	RIII, IV

Les résultats sont issus de la littérature, à l'exception

- des croix rouges qui représentent les résultats que nous avons relativisés à la suite de cette étude,
- des résultats sur fond jaune que nous avons obtenus lors de cette étude



**Effects of cropping systems on the sensitivity of winter wheat to *Fusarium* head blight and its contamination by associated mycotoxins**

Agnès Champeil (2004)

**Abstract**

This study is concerned with both integrated wheat protection and food safety. It aims at understanding why and how agricultural practices may influence *Fusarium* head blight development in winter wheat and the mycotoxin contents of grains. We first designed grain sampling procedures appropriate for *Fusarium*-mycotoxin assays. Then, we analyzed the relationships between cropping systems, visible symptoms of *Fusarium* head blight, infecting species (and strains within these species), and grain contamination by mycotoxins. Two experimental designs were used : thirty organic farmers' plots located throughout western Ile-de- France (during two years), and a longer-term trial comparing four different cropping systems : organic, conventional, integrated, and direct drilling systems (during four years).

As a contribution to the formulation of guidelines for reliable sampling procedures for mycotoxin measurements in agronomic experiments, we showed that manual harvest was acceptable if a large enough amount of grain was collected (1 kg of grains), over the entire plot area. Grinding the grains was most effective for homogenizing the sample and therefore decreasing variability of toxicological results. It was critical to separate grains from the more highly contaminated glumes.

No clear relationship between visible symptoms and contamination levels was found under our experimental conditions, which had led to relatively few symptoms and relatively low average contamination. Because of these low levels, identifying the factors controlling mycotoxin production was not possible, and it was not possible either to reliably predict grain contamination at harvest, neither from aliquot sampling nor from symptom determination during the grain-filling period.

None of the generally accepted assumptions of the literature concerning the effects of cropping practices on *Fusarium* head blight attacks appeared to be really valid under our conditions. Nevertheless, on the one hand, there was a significant correlation between the ratio of nitrogen to fructose in ears at flowering and the extent of grain infection by *Fusarium* and *Microdochium* fungi (or the intensity and severity of head blight's attack). On the other, *Fusarium*-associated contaminating mycotoxins were correlated with the amount of residues from a precedent host, and with low ratios of nitrogen to potassium in ears at flowering. *F. culmorum* seems to be directly involved in controlling production of both deoxynivalenol and nivalenol : its greater abundance after direct drilling could explain the stronger contamination levels in this system. Interactions between the various species of toxin-producing fungi, as well as interactions between toxin-producing and non-producing fungi, might also exist and account, for instance, both for unexplained variability and for the poor effects of anti-fungi treatments.

Complementary studies at the interface of agronomy, pathology, and molecular biology will presumably be of interest.

**Key words :** *Fusarium* head blight, *Microdochium*, mycotoxin, deoxynivalenol, nivalenol, wheat, organic agriculture, diagnosis methodology

**Contribution à la compréhension des effets des systèmes de culture  
sur l'infection des cultures de blé tendre d'hiver par la fusariose  
et la contamination des grains par les mycotoxines associées**

Agnès Champeil (2004)

**Résumé**

Le travail présenté s'inscrit dans une double préoccupation de protection intégrée des cultures et de sécurité sanitaire. L'objectif est d'étudier comment les pratiques culturales dans les champs de blé influent sur le développement de la fusariose de l'épi et la production de mycotoxines fusariennes. Les procédures d'échantillonnage pour le dosage des toxines ont d'abord été évaluées. Puis, nous avons analysé les corrélations éventuelles entre pratiques culturales, symptômes de fusariose sur l'épi, contamination en mycotoxines des grains, et infection de la parcelle par telle ou telle combinaison des différentes espèces (ou souches) de pathogènes. Deux dispositifs ont été suivis : un réseau comparant 30 parcelles cultivées en agriculture biologique dans des milieux différents, pendant deux ans, et un essai comparant différents systèmes de culture (biologique, conventionnel, intégré, et sans travail du sol avec couverture permanente) dans un même lieu, pendant quatre ans.

Pour que les prélèvements au champ permettent de caractériser de façon fiable le niveau de contamination de la parcelle, nous avons établi quelques règles concernant la procédure de prélèvement : prélever une quantité suffisante d'épis (au moins 1 kg de grains), bien répartis dans la parcelle (quadriller la parcelle, par 10 botillons par exemple), broyer les grains pour homogénéiser au mieux l'échantillon sur lequel les toxines seront analysées. Avant même le broyage, une séparation soigneuse des grains et des organes végétatifs est essentielle pour que le niveau de contamination en toxines des premiers ne soit pas surévalué à cause de la présence de résidus des seconds, beaucoup plus fortement contaminés en termes de  $\mu\text{g}$  de toxine par kg de matière végétale.

Aucune relation stable entre les symptômes visibles sur les épis et la contamination des grains par les mycotoxines n'a été observée dans nos conditions expérimentales, où les niveaux d'attaque et de contamination de nos parcelles sont restés en moyenne relativement modérés. Il ne semble donc pas possible d'établir un modèle prédisant la teneur en mycotoxines à la récolte à partir des symptômes observés auparavant sur les épis.

Aucune des hypothèses simples de la littérature concernant un effet des pratiques culturales sur la fusariose de l'épi n'a été vraiment validée. En revanche, une corrélation positive a été observée entre un paramètre nutritionnel du blé, le rapport des quantités d'azote sur celles de fructose dans les épis à la floraison, et le taux d'infection des grains par les agents du complexe fusarien ou les symptômes visibles de la fusariose (intensité ou gravité). En ce qui concerne la production de mycotoxines fusariennes (et non plus les symptômes visibles de la maladie), nous avons trouvé qu'elle était corrélée à la présence de résidus de la culture précédente -pour autant que cette culture précédente soit sensible elle-même à la fusariose-, et à des valeurs faibles du rapport du taux d'azote sur celui de potassium dans les épis à la floraison. *F. culmorum* semble être une espèce très importante tant pour la production de déoxynivalénol que de nivalénol ; sa plus forte présence dans les systèmes sans travail du sol pourrait expliquer les plus forts taux de contamination dans ce système. Cependant, la production de mycotoxines semble en partie résulter d'interactions complexes, de compétition ou de synergie, entre les différentes espèces de *Fusarium* productrices de toxines, ou entre elles et les espèces non productrices de toxines (faisant ou non partie du complexe fusarien) ; ces interactions probables contribuent à minimiser l'effet d'éventuels traitements fongicides de cultures.

Ce travail suggère l'intérêt d'un travail à l'interface de l'agronomie et de la pathologie, à l'échelle du champ comme à l'échelle de la souche de pathogène, et appelle des études complémentaires à l'interface de ces champs d'activité.

**Mots-clés** : fusariose, *Fusarium*, *Microdochium*, mycotoxines, déoxynivalénol, nivalénol, blé, agriculture biologique, diagnostic agronomique