

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DES RÉSISTANCES AUX FONGICIDES CARBOXAMIDES DANS LES POPULATIONS BELGES DE ZYMOTSEPTORIA TRITICI

Présentée par Alice Nysten

Promoteurs :

Prof. Anne Legrève (UCL/ELI/FYMY)

Dr. Maxime Duvivier (CRA-W)

Lecteurs :

Prof. Jacques Mahillon (UCL/ELI/MIAE)

Dr. Pierre Hellin (CRA-W)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de master bio-ingénieur en agronomie.

Année académique 2017 – 2018

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier mes encadrants qui m'ont suivie et aidée dans mon travail de recherche, ma promotrice Anne Legrève, professeure à l'UCL ainsi que mon promoteur Maxime Duvivier, attaché scientifique au CRA-W de Gembloux. Ils ont su m'accompagner et me guider dans mon mémoire.

Je suis reconnaissante envers les membres du jury, Jacques Mahillon et Pierre Hellin en espérant que la lecture leur soit agréable et qu'ils apprécient le travail réalisé cette année.

Une deuxième fois merci à Pierre Hellin pour son aide en laboratoire et les protocoles mis en place au cours de l'année.

Un merci particulier à tous les membres du laboratoire de phytopathologie de l'UCL, notamment Charlotte et Jean-Marie pour leurs nombreux coups de main et leur patience. Ainsi, qu'à Brigitte et Marc Migon pour le travail réalisé en serres.

Un remerciement à Olivier Mahieu du CARAH et à Maxime Duvivier du CRA-W de Gembloux pour les données et les échantillons gentiment fournis des champs expérimentaux de Ath et Thy-le-Château.

Je suis également reconnaissante du climat dans laquelle nous avons travaillé avec les étudiants-mémorants et particulièrement Lucas avec qui j'ai réalisé les manipulations au laboratoire. Merci à vous pour ce partage et cette motivation d'y arriver tous ensemble.

Finalement, merci à mes proches qui m'ont soutenue durant ces années d'études et m'ont rassurée dans mes choix. Merci à mes parents et ma grand-mère Plum pour leurs relectures et leurs conseils avisés.



TABLE DES MATIÈRES

Introduction	1
Objectifs	3
I. Revue bibliographique	5
I.1. Le blé	5
I.1.1 Historique et situation en Wallonie.....	5
I.1.2 Les ravageurs du blé.....	6
I.2. L'agent pathogène : <i>Zymoseptoria tritici</i>	9
I.2.1. Symptômes et pertes	9
I.2.2. Épidémiologie.....	10
I.2.3. Diversité génétique	12
I.2.4. Interaction plante-pathogène.....	13
I.2.5 Stratégies de lutte contre la septoriose.....	14
I.2.5.1. Leviers agronomiques	14
I.2.5.2. Lutte chimique.....	16
I.3. Résistance aux fongicides	23
I.3.1 Mécanismes des résistances	23
I.3.2 Facteurs clés dans le développement des résistances.....	26
I.3.3 Gestion du risque d'apparition des résistances	27
I.3.4 Situation des résistances aux SDHI en Europe.....	30
II. Partie expérimentale	35
II.1. Échantillonnage en champs expérimentaux.....	36
II.2. Isolements mono-conidiens et conservation	39
II.3. Évaluation de la sensibilité des souches.....	43
II.4. Séquençages du gène cible.....	47
II.5. Analyse des traits d'agressivité	51
II.6. Analyses statistiques des données.....	54

III. Résultats.....	55
III.1. Sévérité et rendements en champs	55
III.2. Résultats des isollements	58
III.3. Caractérisation phénotypique des souches	59
III.4. Caractérisation moléculaire des séquences	71
III.5. Caractérisation des traits d'agressivité des souches.....	73
IV. Discussion.....	79
IV.1. Résistances aux SDHI en Wallonie	79
IV.2. Influence des programmes fongicides	84
IV.3. Séquençage et Agressivité des souches.....	85
V. Conclusion et perspectives.....	89
Références	93

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Symptômes des maladies fongiques principales retrouvées en Belgique.....	7
Figure 2: Photos des symptômes causés par <i>Z. tritici</i>	9
Figure 3: Photos des cirrhes de <i>Z. tritici</i>	11
Figure 4: Ligne du temps reprenant l'évolution des lancements de molécules fongicides SDHI et des pathogènes ciblés.....	18
Figure 5: Schéma des flux d'électrons à travers le complexe II illustrant la position des différents cofacteurs.....	20
Figure 6 : Schéma représentant les mécanismes de résistance des fongicides uni-sites.....	23
Figure 7 : Distribution de la sensibilité des souches « baseline » (2005 à 2010, N=209) et de 2015 (N=93) face au penthiopyrade.	31
Figure 8 : Distribution de la sensibilité des souches de la population de <i>Z. tritici</i> en Irlande correspondant aux valeurs de LogEC50 testées au fongicide	31
Figure 9 : Efficacité de différentes molécules SDHI sur des isolats <i>Zymoseptoria tritici</i> dont le gène de la succinate déshydrogénase est de type sauvage ou avec les substitutions d'acide aminé.....	32
Figure 10: Schéma expliquant les 6 étapes expérimentales mises en place lors de ce mémoire.	35
Figure 11 : Carte de la Belgique situant les deux champs expérimentaux de Ath et Thy-le-Château	36
Figure 12: Illustration des principales étapes d'isolement mono-conidien de souches de <i>Z. tritici</i>	40
Figure 13 : Structures moléculaires des molécules fongicides : A) le fluxapyroxad et B) le fluopyram.	43
Figure 14 : Organisation d'une plaque de 96 puits utilisée dans le test-fongicide permettant la détermination des valeurs EC50 des souches pour un produit fongicide.....	44
Figure 15 : Méthodologie du test fongicide in vitro utilisé pour évaluer la sensibilité des souches de <i>Zymoseptoria tritici</i> en plaques multi-puits.....	45
Figure 16 Schéma du protocole de PCR, de séquençage et d'analyses des séquences du gène SDH-C des souches de <i>Z. tritici</i>	49
Figure 17 : Étapes de l'inoculation en serres pour le test « traits de fitness ».	52
Figure 18 : Clef de cotation des symptômes sur feuille de blé inoculée par des souches de <i>Z. tritici</i> sur une zone de 5 centimètres.	53
Figure 19 : Sévérité moyenne exprimée en pourcentage de surface foliaire infectée par de la septoriose sur les derniers étages foliaires (F1 et F2) lors du développement des grains....	55
Figure 20: Comparaison des moyennes des gains de rendement brut (en kilos de blé par hectare).....	56
Figure 21: Comparaison des moyennes de gains de rendement net (par kilos de blé par hectare).....	57
Figure 22: Comparaison de la sensibilité au fluxapyroxad des souches de <i>Z. tritici</i> isolées dans des parcelles non traitées en 2008-2009 (baseline) et 2016-2017 (actuelle).....	60

Figure 23 : Comparaison de la sensibilité au fluxapyroxad des populations de souches de <i>Z. tritici</i> provenant de parcelles expérimentales traitées avec 4 programmes fongicides différents (TE, T1, T2 et T3).....	61
Figure 24 : Comparaison de la sensibilité au fluxapyroxad de quatre populations de souches de <i>Z. tritici</i> classées en fonction des modalités de traitements fongicides appliquées dans leurs parcelles expérimentales (TE, T1, T2 et T3).....	62
Figure 25 : Comparaison de la sensibilité moyenne au fluxapyroxad de populations de souches réparties selon leur origine (Ath ou Thy-le-Château) ou selon leur année d'isolement (2016 ou 2017).....	63
Figure 26 : Évolution de la distribution de la sensibilité au fluxapyroxad des souches de <i>Z. tritici</i> isolées de parcelles non traitées au fil du temps.....	64
Figure 27 : Comparaison de la sensibilité au fluopyram des souches de <i>Z. tritici</i> isolées dans des parcelles non traitées en 2008-2009 (baseline) et 2016-2017 (actuelle).....	65
Figure 28 : Comparaison de la sensibilité au fluopyram des populations de souches de <i>Z. tritici</i> provenant de parcelles expérimentales traitées avec 4 programmes fongicides.....	66
Figure 29 : Comparaison de la sensibilité au fluopyram de quatre populations de souches de <i>Z. tritici</i> classées en fonction des modalités de traitements fongicides.....	67
Figure 30 : Comparaison de la sensibilité moyenne au fluopyram de populations de souches réparties selon leur origine et année d'isolement.....	68
Figure 31 : Évolution de la sensibilité au fluopyram (en $\log_{10}(EC_{50})$) des souches de <i>Z. tritici</i> isolées de champs non traités au fil du temps.....	69
Figure 32 : Résistance croisée entre les matières actives fluopyram et fluxapyroxad sur les souches de <i>Z. tritici</i>	70
Figure 33 : Comparaison de l'agressivité des souches de <i>Z. tritici</i> testées sur quatre variétés de blé ayant des sensibilités différentes face à l'agent pathogène <i>Z. tritici</i> (variété résistante à plus sensible : Olympus – Chevignon - RGT reform - Henrik).....	74
Figure 34 :Graphe de comparaison de l'agressivité des souches de <i>Z. tritici</i> testées sur la variété de froment Henrik (cotation du 20/04/18 J-17 après l'inoculation).....	76
Figure 35 : Graphe de comparaison de l'agressivité des souches de <i>Z. tritici</i> testées sur la variété de froment Henrik (cotation du 27/04/18 J-21 après l'inoculation).	77

LISTE DES TABLES

Tableau 1: Tableau reprenant les molécules des deux groupes de fongicides SDHI utilisés depuis 1966 en Europe (Anne-Sophie Walker, 2011).	20
Tableau 2: Données phytotechniques des champs expérimentaux (Ath et Thy-le-Château) et pour chaque année (2016 et 2017).....	37
Tableau 3: Description des traitements fongicides réalisés dans les parcelles	37
Tableau 4 : Composition du mélange pour la réalisation de la PCR pour l'amplification du gène SDH-C.....	48
Tableau 5: Résumé de la sensibilité aux fongicides (EC50 en mg/L) des 242 souches belges de <i>Z. tritici</i> par matière active (fluopyram et fluxapyroxad).....	59
Tableau 6 : Souches belges de <i>Z. tritici</i> et leurs EC50 lors des tests face au fluxapyroxad et au fluopyram ainsi que leurs mutations dans la sous-unité C du gène SDH.....	72
Tableau 7: Comparaison de la sensibilité (EC50 en mg/L) des souches la baseline de <i>Z. tritici</i> en Belgique ou en Irlande.....	82
Tableau 8: Comparaison de la sensibilité moyenne au fluxapyroxad (EC50 en mg/L) entre les populations actuelles en Irlande et en Belgique	82

ABRÉVIATIONS

°C: degré Celsius

ABC: ATP-binding cassette

ANOVA: Analysis of variance

ATP: Adenosine triphosphate

DMI: Demethylation inhibitors

DMSO: Dimethyl sulfoxide

ADN: Deoxyribonucleic acid

Édition LBC: Livre Blanc «Céréales» ULg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W

FAO: Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

FRAC: Fungicide Resistance Action Committee

IPM: integrated pest management

LBC: Livre Blanc des Céréales

MDR: Multiple drug resistance

MFS: Major facilitator superfamily

min : minutes

PCR: Polymerase chain reaction

PDA: Potato dextrose agar

QoI: Quinone outside Inhibitors

SDHI: Succinate déshydrogénase inhibitor

sec : secondes

SNK: Student-Newman-Keuls

UE: Union Européenne

INTRODUCTION

Le blé (*Triticum aestivum* L.) est une plante annuelle de la famille des Poaceae. Cette culture est produite dans de nombreuses régions du monde et représente en terme de tonnes produites par année, la troisième céréale mondiale après le riz et le maïs. Selon la FAO, la production mondiale de blé en 2016 était estimée à 746,7 millions de tonnes. La production de l'Union Européenne est l'une des plus importantes et atteignait 21% de la production mondiale en 2011 (Gavira et Burny, 2012¹).

En Belgique et dans les pays frontaliers, le blé est exposé à plusieurs maladies fongiques telles que la rouille jaune (*Puccinia striiformis*), la rouille brune (*Puccinia triticina*), l'oïdium (*Blumeria graminis*), les fusarioses (*Microdochium spp.* et *Fusarium spp.*) ou encore la septoriose du blé (*Septoria tritici* blotch en anglais). Cette dernière est l'une des maladies du blé la plus préjudiciable en Wallonie. L'augmentation de son l'incidence depuis les années 60 est notamment due à l'introduction de cultivars de blé à maturation précoce et aux changements de nos pratiques culturales comme l'utilisation de la fertilisation azotée (Bayles, 1991).

Cette maladie est désormais difficilement contrôlable et est capable d'occasionner de fortes pertes de rendement. De plus, l'extraordinaire plasticité du génome de *Zymoseptoria tritici*, le champignon responsable de cette maladie, empêche la mise au point de variétés totalement résistantes à ce pathogène. Des recherches en amélioration végétale dans des programmes nationaux, par exemple au Centre de Recherche Agronomique Wallon (CRA-W) ou à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) en France, et dans des programmes internationaux comme l'International Research Initiative for Wheat Improvement (IRIWI) permettent le développement et la mise sur le marché de nouvelles variétés plus performantes et résistantes (ou plus tolérantes) aux différents nuisibles. Néanmoins, ces résistances s'érodent sans cesse, si bien que les fongicides restent une arme efficace et essentielle pour assurer des hauts rendements. En Wallonie, la lutte contre les pathogènes fongiques du blé repose actuellement sur l'application de 1 à 3 traitements fongicides par saison (Bataille, 2018²).

Similairement aux apparitions de bactéries résistantes aux antibiotiques, *Z. tritici* est capable de développer des résistances à certains fongicides, rendant les traitements moins efficaces voire totalement inefficaces. A titre d'exemple, les

¹ Livre Blanc «Céréales» ULg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W, Février 2012.

² Livre Blanc «Céréales» ULg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W, Février 2018.

strobilurines de la famille des Quinone outside Inhibitor (QoI) sont des fongicides ayant été introduits sur le marché européen dans les années 90 (Gisi *et al.*, 2002). Ils ont totalement perdu leur efficacité face à la septoriose en seulement une dizaine d'années via une seule mutation ponctuelle (G143A au niveau du cytochrome B) du gène mitochondrial qui s'est propagé dans l'ensemble des populations européennes (Cheval *et al.*, 2017). Les fongicides azolés intervenant sur la voie de biosynthèse de l'ergostérol font également face au développement de résistances partielles via différents mécanismes (mutations au niveau du gène CYP51). Néanmoins, la résistance à cette famille de fongicides évolue de manière graduelle suite à l'accumulation au cours du temps de différents mécanismes au sein des populations (Cools *et al.*, 2012). Depuis une dizaine d'années³, de nouvelles molécules de la famille des carboxamides ont largement été introduites sur le marché belge des céréales. Ce sont des fongicides qui inhibent la succinate déshydrogénase (SDHI). Ils sont depuis plusieurs années utilisés par la majorité des agriculteurs au moins une fois par saison. En général, ils sont vendus en association avec des produits d'autres familles de fongicides. La diversité des modes d'actions permet de limiter l'émergence des résistances. A ce jour, très peu d'informations sont disponibles sur le développement de résistance aux SDHI dans les populations belges ou wallonnes de septoriose. Or, des publications dans les pays comme le Royaume-Uni, l'Irlande ou la France alarment déjà sur les résistances face aux carboxamides. Depuis 2012, on retrouve, en faible nombre, des souches de *Z. tritici* présentant des sensibilités réduites aux carboxamides en Irlande par exemple (Dooley, 2015).

Notre législation européenne stricte (réglementation 1107/2009), réduit d'année en année le nombre et la diversité des molécules fongicides (Hillock et Cooper, 2012). Le nombre de substances actives (s.a.) présentes sur le marché belge des pesticides a été réduit de 358 à 260 entre 1995 et 2010 suite à l'imposition de normes européennes strictes qui ont pour but d'assurer la protection de la santé humaine et de l'environnement⁴. Les stratégies de lutte sont donc plus limitées et moins flexibles. Il est important de suivre et d'étudier les mécanismes de résistances émergeant dans les populations de pathogènes afin de conserver l'efficacité des fongicides existants et d'assurer des rendements au champ en utilisant des itinéraires phytotechniques qui intègrent des programmes fongicides durables.

³ BASF Agro lance le produit « BELL » sur céréales en 2007 à base de boscalid.

⁴ Rapport du Programme wallon de réduction des pesticides 2018-2022 (PWRP II).

OBJECTIFS

L'objectif principal du mémoire est d'évaluer le niveau de résistance aux fongicides SDHI dans les populations de septoriose prélevées récemment en Wallonie. Pour ce faire, le niveau des résistances a été mesuré par des valeurs d'EC50⁵ dans des populations de septoriose prélevées sur deux sites en 2016 et les deux mêmes sites en 2017. Ce niveau de résistance au sein des populations a été comparé à celui mesuré dans des populations prélevées en 2008 et 2009, avant la mise sur le marché des céréales à large échelle des produits SDHI en Wallonie. Il a également été comparé entre les sites afin d'estimer l'influence de la localisation des parcelles. D'autre part, une caractérisation génotypique des souches résistantes identifiées a été réalisée par séquençage d'ADN de la sous-unité C du gène SDH (SDH-C) afin d'évaluer la présence de mutations ponctuelles au sein du gène cible des SDHI.

Le second objectif consiste à évaluer l'influence de programmes fongicides sur la sélection de souches résistantes aux fongicides SDHI. Le programme fongicide le plus couramment appliqué dans les champs wallons consiste en un premier traitement au stade 2^{ème} nœud à l'aide de triazoles et d'un fongicide multi-site et ensuite un second traitement au stade épiaison avec une solution commerciale SDHI (triazoles + SDHI) à dose conseillée. La sélection de souches résistantes obtenues avec ce programme fongicide sera évaluée et comparée au programme comprenant une dose réduite de la solution commerciale SDHI. Ces résultats seront également comparés à la sélection obtenue avec un traitement unique au stade dernière feuille à l'aide d'une solution commerciale SDHI.

Le troisième objectif visé dans le cadre de ce travail est de comparer le pouvoir pathogène des souches selon leur niveau de résistances aux substances SDHI face à quatre variétés de blé présentant des résistances différentes à la septoriose. Cette dernière expérience a pour but de déterminer si une valeur d'EC50 élevée ou la présence de mutations lui conférant une résistance aux substances SDHI, influence la valeur sélective⁶ des souches sur un spectre de variétés de blé durant une période sans pression fongicide.

⁵ Les valeurs EC50 sont les doses de fongicides limitant la croissance mycélienne par 50%.

⁶ La valeur sélective, succès reproducteur ou valeur adaptative (fitness en anglais) décrit la capacité d'un individu d'un certain génotype à se reproduire au sein d'une population. Messiaen (1981) avait proposé de traduire le « fitness » par le néologisme d'adaptitude.

I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. LE BLÉ

I.1.1 Historique et situation en Wallonie

La domestication du blé remonte à 10.000 ans (Zohari et Hopf, 2000). Trois céréales marquent le début de cette domestication à savoir l'amidonnier (*Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccoides*), l'engrain (*Triticum monococcum* L. spp. *Aegilopoides*) et l'orge (*Hordeum vulgare*) (Harlan et Zohary, 1966). L'endroit le plus probable pour la domestication semble être la région du sud de la Turquie d'après les relations génétiques entre les espèces sauvages et domestiques d'engrain et d'amidonnier (Heun *et al.*, 1997). Le croisement spontané entre l'amidonnier, et une graminée sauvage (*Aegilops squarrosa*) fait apparaître une nouvelle espèce, *Triticum aestivum*, qui donnera naissance aux variétés de blés tendres (Bonjean, 2001). Des croisements provoqués par l'homme viennent enrichir la base génétique du blé grâce aux nombreux échanges entre les romains et les grecs durant l'Antiquité. Les premiers travaux d'amélioration végétale avec l'obtention de lignées pures⁷ commencent avec les travaux de Vilmorin (Bonjean et Leblond, 2000). A partir des années 1945, l'amélioration du blé prend de la vitesse afin de répondre aux nouvelles demandes comme la résistance au froid, aux maladies ou à des attentes de qualité boulangère. C'est à partir de 1960 que commence l'utilisation de variétés de toutes les origines dans les travaux de sélection. Les croisements entre des parents portant des gènes intéressants ont pour but de rassembler le maximum de gènes d'intérêt dans la même variété. Les travaux de sélection ont permis d'atteindre des rendements exceptionnels qui sont passés de 26,7 q/ha dans les années 60 à 77,5 q/ha en 1998 en France par exemple (Bonjean, 2001).

Jadis, le blé était principalement cultivé dans les zones à climats tempérés et subtropicaux mais les améliorations végétales ont permis un agrandissement de sa zone de culture. Des nouveaux défis émergent au fil du temps comme le changement climatique, la volonté de réduire les intrants et les pesticides dans nos champs, de diminuer la sensibilité aux maladies et d'augmenter les qualités nutritives de nos aliments. Les finalités du blé sont diverses car il peut être utilisé pour la panification, la biscuiterie, l'alimentation animale et depuis quelques années la fabrication de carburant (éthanol).

⁷ Les lignées pures sont des variétés qui conservent leurs caractères d'une génération à l'autre.

Le blé est la céréale la plus cultivée en superficie en Wallonie (Delcour *et al.*, 2014). Pour l'année 2016 en Wallonie, le SPF Économie renseigne une superficie de 132.085 ha emblavée avec du blé d'hiver. La production totale est évaluée à 1.118.760 tonnes avec une moyenne de 8,47 tonnes par hectare. Le prix de vente retenu pour le blé était de 140 euros la tonne pour la saison 2016-2017.

I.1.2 Les ravageurs du blé

Le blé peut être la cible de nombreux nuisibles (des ravageurs, des champignons, des bactéries ou encore des virus) qui peuvent détruire les différents organes du blé tels que le pied, les feuilles ou l'épi. Les attaques peuvent avoir lieu à différents stades de la culture et en fonction de leur intensité entraînent plus ou moins de dégâts tant sur le rendement que sur la qualité du blé.

Les principaux pathogènes du blé (figure 1) rencontrés en Wallonie sont décrits ci-dessous :

La septoriose est une maladie des taches foliaires causées par des ascomycètes nécrotrophes. L'agent *Zymoseptoria tritici* est retrouvé dans les champs de blé belges chaque année contrairement à la septoriose causée par l'agent *Parastagonospora nodorum* qui est très peu rencontré en Belgique. Cette maladie pose problème en Europe car aucune variété actuelle n'est totalement résistante. Son développement est favorisé par les précipitations, le vent, les températures et l'architecture de la plante. Elle est présente tout au long de la saison et des symptômes sont déjà observables sur les premières feuilles avant l'hiver. Ces caractéristiques épidémiologiques lui permettent d'évoluer rapidement face aux fongicides et de développer des mécanismes de résistances (Bataille, édition LBC 2018).

Les rouilles sont des organismes biotrophes obligatoires qui ne colonisent donc que des tissus vivants. Ces agents font partie de la famille des basidiomycètes et du genre *Puccinia*. On dénombre trois rouilles sur le blé mais on retrouve principalement la rouille jaune, *Puccinia striiformis* et la rouille brune, *Puccinia triticea* en Wallonie. La rouille noire (*Puccinia graminis*) est rarement visible dans nos régions. Ces agents de rouille ont une capacité de dispersion et des cycles de développement court qui leur permettent de se propager rapidement à travers les parcelles de culture et d'induire des épidémies explosives. La rouille est capable d'évoluer dans les cultures tant que les températures ne dépassent pas les 25°C (Bataille, édition LBC 2018). La rouille brune, à l'inverse de la rouille jaune qui préfère des températures moyennes comprises entre 9 et 15°C, préfère des températures plus élevées (températures moyennes optimales de 15 à 25°C).

L'oïdium sur blé est causé par le parasite obligatoire *Blumeria graminis*. Il se développe lors de températures douces (15 à 20°C) dans les cultures denses. La maladie devient sévère lorsqu'il sévit sur l'épi. Les efforts de sélection variétale ont permis de réduire considérablement les dégâts liés à cet agent.

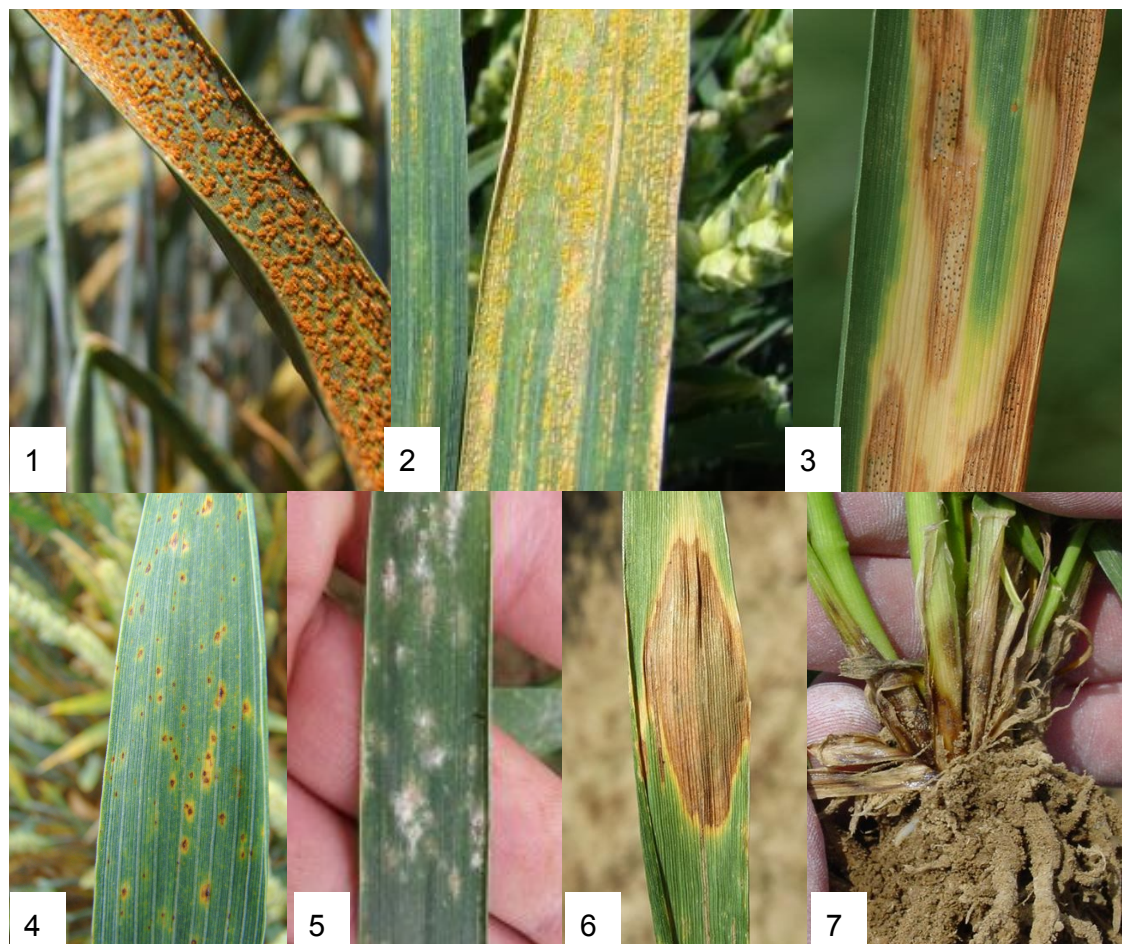


Figure 1: Symptômes des maladies fongiques principales retrouvées en Belgique. N°1. Rouille brune, N°2. Rouille jaune, N°3 Septoriose sur blé, N°4 Helminthosporiose sur blé, N°5 Agent d'oïdium, N°6 Fusarium sur feuilles, N°7 Piétin-verse. Sources diverses : Livre Blanc des Céréales et Arvalis, institut du végétal.

La fusariose de l'épi est quant à elle, une maladie causée par un complexe d'espèces reprenant deux genres : *Fusarium spp.* et *Microdochium spp.* Ces agents sont très influencés par le climat et les conditions humides particulièrement. Sur feuilles, les symptômes de *Microdochium nivale* peuvent apparaître du déploiement à la dernière feuille. Les épis sont quant à eux contaminés par *Fusarium spp.* ou *Microdochium spp.* lors de l'épiaison et la floraison. C'est l'espèce *F. graminearum* qui est la plus problématique en raison de sa production de mycotoxines (DON, déoxynivalénol) dans les grains (Fiches d'Arvalis, Institut du Végétal).

De façon plus sporadique, on peut retrouver plusieurs autres agents sur les cultures de blé. L'helminthosporiose est causée par un ascomycète, *Pyrenophora tritici-repentis*, qui se développe durant le printemps et l'été sur les deux faces des feuilles et est souvent confondue avec de la septoriose. Les taches brunâtres entourées d'un halo jaune ne présentent qu'un point noir d'infection contrairement à la septoriose qui admet de nombreux points noirs (pycnides), ce qui permet de les différencier facilement. Le piétin-verse quant à lui est causé par les deux pathogènes *Oculimacula yallundae* et *O. acuformis*. Ils sont favorisés par des sols humides. Les symptômes se situent entre la base et le premier nœud et lors d'attaques sévères, il est possible que la culture verse. Enfin, le piétin-échaudage causé par *Gaeumannomyces graminis tritici* est un champignon du sol qui contamine les racines (Fiches d'Arvalis, Institut du Végétal). Les attaques se répartissent en bande où les feuilles jaunissent par leur pointe jusqu'à l'échaudage complet de la plante.

A côté des maladies fongiques, certains insectes peuvent induire de lourdes pertes de rendements. Les cécidomyies orange (*Sitodiplosis mosellana*), équestres (*Haplodiplosis marginata*) et les mouches de semis (*Delia platura*) sont les principales retrouvées en Wallonie. Des ravageurs du sol comme des taupins (*Agriotes spp.*) ou des tipules (*Tipula spp.*, *Nephrotoma appendiculata*) provoquent également des dégâts. Des plus gros ravageurs comme les limaces grises (*Deroceras reticulatum*) ou noires (*Arion sylvaticus*), les oiseaux comme le corbeau freux (*Corvus frugilegus*), les blaireaux et les sangliers peuvent aussi nuire à la récolte.

Des bactéries et certains virus peuvent aussi contaminer le blé. Ces nuisibles sont généralement plus anecdotiques en Wallonie. Bien que généralement peu importante en Wallonie, la maladie bactérienne la plus connue est celle des stries bactériennes ou glume noire causée par *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*. Quant aux maladies virales, elles sont transmises par un champignon du sol nommé *Polymyxa graminis*. Il en existe deux principales qui sont la maladie de la mosaïque par le Soil Borne Céréale Mosaic Virus (Sbcmv) et la maladie des stries en fuseaux par le Wheat Spindle Streak Mosaic Virus (Wssmv). On peut également mentionner la jaunisse nanissante qui est causée par le virus Bydv (Barley yellow dwarf virus) et transmise par des pucerons (essentiellement *Rhopalosiphum padi*). Elle souvent retrouvée sur l'orge peut poser problème certaines années en blé.

Ce bref aperçu décrit de façon non-exhaustive les agents pathogènes capables de provoquer des pertes de rendement en blé. Il est essentiel de cerner les nuisibles du blé pour maîtriser les différentes interventions dans la culture et garantir un rendement optimum. Ce mémoire porte sur le champignon pathogène du blé le plus problématique à contrôler en Wallonie : la septoriose causée par *Z. tritici*.

I.2. L'AGENT PATHOGÈNE : ZYMOSEPTORIA TRITICI

I.2.1. Symptômes et pertes

L'étude porte sur l'ascomycète hétérothallique⁸ anciennement connu sous le nom de *Mycosphaerella graminicola* pour sa phase téléomorphe (sexuée) ou encore de *Septoria tritici* pour sa phase anamorphe (asexuée). La septoriose causée par l'agent haploïde *Zymoseptoria tritici* est rencontrée chaque année dans les champs wallons. Bien qu'elle soit endémique, les conditions climatiques annuelles ainsi que les conditions spécifiques de la parcelle (comme par exemple la résistance variétale) vont influencer la dynamique et l'intensité de l'épidémie dans un champ (Suffert, 2015; Moreau et Maraite 2000; Duvivier, 2015). En Europe, les pertes directes et de contrôle coûteraient aux producteurs 280 à 1200 millions d'euros par an (Fones et Gurr, 2015). Les attaques peuvent, dans les pires cas, entraîner jusqu'à 40% de perte de la récolte (Eyal *et al.*, 1987). C'est lorsque l'infection atteint les trois derniers étages foliaires que les dégâts s'avèrent les plus sévères sur le rendement (Shaw et Royle 1989b; Thomas *et al.*, 1989). Ces pertes sont réduites à 5-10% sur les variétés de blé résistantes et lorsque les cultures sont pulvérisées avec un ou plusieurs traitements fongicides (Fones et Gurr, 2015).

Lors de la contamination d'une feuille, les symptômes débutent par l'apparition de petites taches chlorotiques (figure 2b). Elles apparaissent après une période de latence dépendant de la température. Elles vont virer du brun au gris et finir par se nécroser. Elles sont visibles sur les deux faces du limbe. Ensuite, de petits points noirs qui sont nommés pycnides apparaissent dans les taches nécrosées.

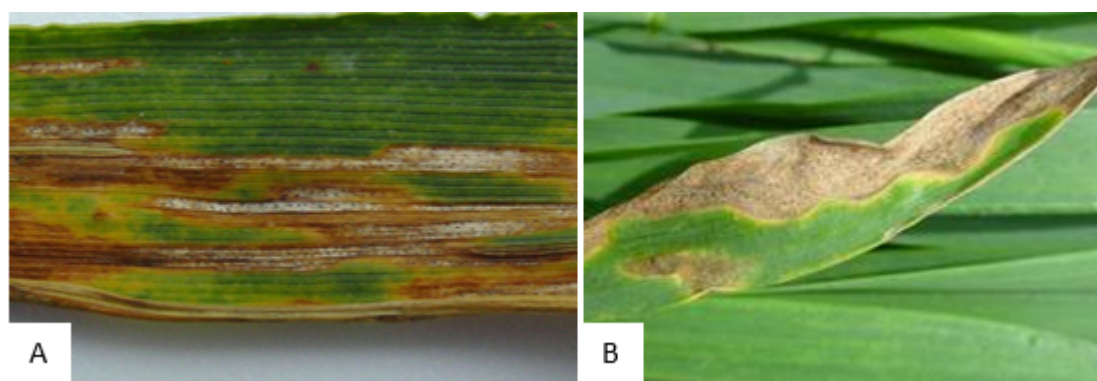


Figure 2: Photos des symptômes causés par *Z. tritici*. En A: Des nécroses avec des pycnides accompagnés de taches blanches allongées qui sont plus rarement observées. En B: des taches brunes-grises contenant des pycnides. Source : CRA-W de Gembloux.

⁸ Hétérothallique fait référence à l'hétérothallie qui est le cas où les gamètes des deux sexes sont produits par des gamétophytes différents.

A la fin du printemps, un autre type de symptômes est parfois observé (figure 2a) sur les étages supérieurs des plantes de blé. Il s'agit de petites taches blanchâtres allongées. Il semblerait que certaines variétés soient plus sujettes à développer ce type de symptômes. Les épis des plantes ne sont pas touchés contrairement à l'autre septoriose, *Parastagonospora nodorum*. Le remplissage des grains est toutefois influencé par le moment et la vigueur de l'attaque au cours de la saison. La photosynthèse des feuilles sera altérée par les nécroses et le rendement en grains en sera influencé (Evans *et al.*, 1975).

I.2.2. Épidémiologie

Le cycle de vie de la septoriose est complexe et comprend une phase de reproduction sexuée et une phase asexuée. Deux types de propagules infectieuses interviennent dans les épidémies (Palmer et Skinner, 2002). Le premier type est celui des ascospores aériens produits dans des pseudothèces durant la phase de reproduction sexuée. Le deuxième est celui des pycnidiospores (ou nommées également conidies) qui sont produites dans les pycnides lors de la phase asexuée. Le champignon va survivre d'une saison à l'autre sous forme de mycélium, pycnides et pseudothèces sur les résidus de culture et les plantes hôtes (Suffert *et al.*, 2013).

La principale infection primaire des champs nouvellement semés est généralement causée par les ascospores aériennes (Suffert *et al.*, 2011) sur les jeunes semis de l'automne. C'est le croisement entre deux souches de « mating-type » différent qui permet la formation des périthèces et les conditions d'humidité favorables entraînent la libération de leurs ascospores (Sanderson et Hampton, 1978). Ces dernières peuvent parcourir de grandes distances et contaminer des champs à plusieurs kilomètres (Linde *et al.*, 2002). Dans les champs emblavés sur un précédent blé, les pycnidiospores formées lors de la reproduction asexuée peuvent aussi participer à l'infection primaire des plantules. Dans les deux cas, les propagules infectieuses vont coloniser l'hôte en entrant par les stomates de ses feuilles (Cohen et Eyal, 1993; Duncan et Howard, 2000). Le mésophile est colonisé par le mycélium en croissance et entraîne la chlorose des zones infectées en seulement 10 jours d'incubation⁹ (Kema *et al.*, 1996c). Ensuite, après une période de latence¹⁰ de 14 à 21 jours, les chloroses deviennent des nécroses et des pycnides noires apparaissent. Les pycnidiospores contenues dans ces fructifications asexuées sont expulsées sous

⁹ La période d'incubation est la durée séparant l'infection et l'apparition des premiers symptômes.

¹⁰ La période de latence est la durée séparant l'infection de la formation de propagules infectieuses.

forme d'une masse gélatineuse, nommée également cirrhe (figure 3a et b), lorsque la feuille est humide. Elles sont dispersées sur les feuilles voisines par les éclaboussures des gouttes de pluie et le contact direct entre les feuilles (Shaw et Royle 1993; Lovell *et al.*, 1997, 2004b). La propagation, qui peut aller jusqu'à 1 mètre, est fonction de l'intensité des pluies qui vont propulser avec plus ou moins de vigueur les cirrhes sur les feuilles des étages supérieurs ou des plantes avoisinantes.

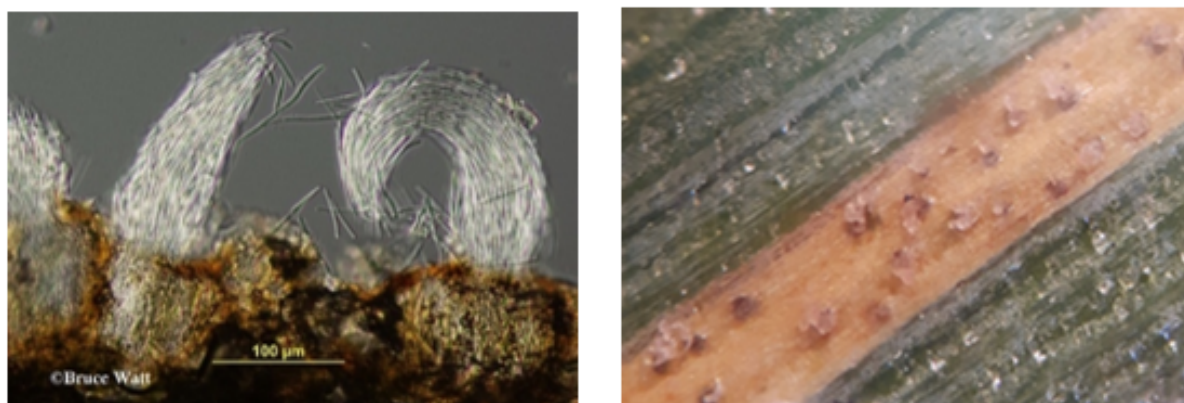


Figure 3: Photos des cirrhes de *Z. tritici*. A gauche, photo d'une coupe transversale des spores contenues dans les pycnides expulsées sous forme de cirrhes (source : Bruce Watt). A droite, photo vue du dessus d'une lésion contenant les cirrhes sortant de leur pycnide (Source : Photo personnelle).

La progression de la septoriose sur les étages supérieurs durant la saison culturale est principalement causée par la dispersion et l'infection par des pycnidiospores. Toutefois, de nombreuses études se sont interrogées sur l'importance de l'inoculum aérien sur la dispersion verticale de la septoriose (Zhan *et al.*, 1998; Linde *et al.*, 2002; Fraaije *et al.*, 2005a). La quantification de l'inoculum aérien de la septoriose en Wallonie à l'aide de capteurs de spores a permis de mettre en évidence la présence d'ascospores tout au long de l'année (Duvivier *et al.*, 2013). Dans des périodes chaudes et sèches, un taux de développement élevé des feuilles pourrait mettre les feuilles supérieures de blé hors de portée des infections des pycnidiospores. Dans cette situation, l'inoculum aérien pourrait intervenir dans leur contamination initiale (Duvivier, 2015). Les infections des étages supérieurs pourraient donc être causées aussi par des ascospores arrivées par le vent et formeraient après leur cycle asexué des foyers d'infection sur les étages supérieurs. L'infection par les pycnidiospores requiert des conditions de températures de minimum de 3-4°C et admet un optimum à 17-19°C (Shaw, 1990; Lovell *et al.*, 2004a; Bernard *et al.*, 2013). Pour compléter un cycle asexué, il faudra compter 17 à 21 jours en Belgique.

La septoriose est caractérisée par une énorme production de particules de dissémination lors de la phase épidémique de la maladie. Le nombre moyen de pycnidiospores produites par une seule pycnide est environ 4000 à 8500 unités (Suffert *et al.*, 2013). Les pycnides ne sont pas toutes matures et capables de libérer leurs spores simultanément mais la charge de spores asexuées par hectare est énorme sur une saison et peut atteindre 10^{10-11} pycnidiospores par hectare (Jenna Watts, HGCA pers. com). Lorsque les conditions sont optimales, 6 cycles de reproduction asexuée sont formés sur une saison culturale et dispersent ainsi une grande quantité de pycnidiospores entraînant une épidémie majeure dans le champ. L'infection primaire par les ascospores n'est donc pas le facteur limitant pour une épidémie. La sévérité de l'épidémie sera plutôt fonction de la sensibilité de la variété implantée et des conditions climatiques de la saison.

A propos de la dispersion verticale au sein de la plante, l'architecture des feuilles et leur sénescence naturelle influencent les épidémies de *Z. tritici* (Lovell *et al.*, 1997). Les souches locales au niveau d'une feuille doivent utiliser les ressources avant que la feuille ne soit sénescente. L'étude de Robert *et al.* (2018) confirme le fait que les souches doivent se propager sur les étages supérieurs en infectant de nouvelles feuilles avant que ces dernières s'éloignent trop de la source d'infection. Quand le taux d'extension des plantes est lent alors le mouvement d'inoculum aurait besoin de moins d'énergie cinétique pour se déplacer vers les étages supérieurs (Lovell *et al.*, 1997). La compréhension de cette dispersion verticale est essentielle pour le rendement en champ car c'est la contamination des trois derniers étages foliaires qui engendre des pertes économiques importantes.

I.2.3. Diversité génétique

Le cycle de vie complexe de *Z. tritici* lui confère un potentiel évolutif élevé. En effet, la reproduction sexuée avec une recombinaison génétique, permet une diversité génotypique dans les populations de souches. Quant au cycle de reproduction asexuée, il multiplie rapidement les génotypes les mieux adaptés de l'année. La diversité génétique de *Z. tritici* est donc très étendue car on retrouve plusieurs souches différentes sur une même feuille. Le séquençage du génome complet de l'isolat néerlandais IPO323 fait office de référence pour *Z. tritici* et est une des séquences de génome fongique la plus complète (Goodwin *et al.*, 2011). Ce champignon admet 21 chromosomes mais seulement 13 sont dits de « base » et les huit autres sont des chromosomes « accessoires » qui codent pour plus de 700 gènes mais n'ont aucune pertinence fonctionnelle (Goodwin *et al.*, 2011). Ces derniers sont majoritairement composés d'éléments transposables et montrent une vitesse d'évolution accélérée par rapport aux chromosomes « de base » (Stukenbrock *et al.*,

2011). Cette grande proportion de chromosomes accessoires est un caractère notable de *Zymoseptoria tritici* qui nous suggère qu'il peut plus facilement perdre sa spécificité vis-à-vis de l'hôte (Stukenbrock *et al.*, 2011) ou encore surmonter la résistance de l'hôte face à la maladie (Mundt *et al.*, 2009; Rudd *et al.*, 2015). Cette plasticité évolutive n'est pas à sous-estimer car cela peut lui permettre de s'adapter relativement facilement aux innovations et de nous distancer.

I.2.4. Interaction plante-pathogène

Concernant la résistance de l'hôte, deux concepts sont impliqués dans la pathogénicité : la virulence et l'agressivité (Rapilly, 1991). La virulence se réfère à la capacité (qualité) d'un agent à se développer dans un organisme et l'agressivité permet à un agent pathogène d'attaquer un hôte avec une plus ou moins grande intensité (quantité). Van der Planck (1968) a introduit la notion de résistance verticale (ou qualitative) opposée à la virulence et la notion de résistance horizontale (ou quantitative) opposée bien évidemment à l'agressivité. La résistance qualitative correspond à une interaction gène pour gène et l'expression du gène seul empêche complètement l'infection si le gène de résistance (R) correspond au gène d'avirulence (Avr) du pathogène. La résistance quantitative est, quant à elle, dirigée par plusieurs gènes dont les effets sont cumulatifs (Schiff *et al.*, 2001) et sont désignés par des loci de caractères quantitatifs (QTL). Les QTL (quantitative trait loci en anglais) sont des régions chromosomiques où sont localisés un ou plusieurs gènes qui ont un effet sur le développement du pathogène (Lindhout, 2002). Vingt gènes majeurs cartographiés, contribuent à la résistance qualitative du blé contre *Z. tritici* (Brown *et al.*, 2015). 18 loci associés à la résistance des plantes ont été identifiés et incorporés dans les programmes de sélection du blé, apportant ainsi une résistance quantitative à la maladie (Orton *et al.*, 2011). Toutefois, la grande diversité de la population et la capacité d'évolution rapide du pathogène causent un contournement rapide des défenses de la plante et limitent ainsi la durabilité des variétés de blé résistantes (Cowger *et al.*, 2000). Il semble que la résistance quantitative possède un meilleur potentiel pour le contrôle de la septoriose. L'utilisation de cultivars résistants permet de diminuer la dépendance aux fongicides en apportant une flexibilité dans les doses et les périodes de pulvérisations (Duvivier, 2015).

I.2.5 Stratégies de lutte contre la septoriose

La lutte intégrée contre les maladies du blé propose de toujours activer des leviers agronomiques avant le recours aux produits chimiques. La protection du blé contre la septoriose en Wallonie est abordée dans les paragraphes suivants sur base notamment des publications du Livre Blanc des Céréales et des avertissements de l'asbl CADCO.

I.2.5.1. Leviers agronomiques

L'agriculteur peut recourir à 5 principaux leviers agronomiques pour diminuer les risques d'épidémies sévères de septoriose :

1. La rotation des cultures
2. Le travail du sol
3. L'utilisation de variétés résistantes
4. La date de semis et l'adaptation de la densité de semis
5. Le raisonnement de fertilisation azotée

Premièrement, la rotation pluriannuelle des cultures permet de tirer un bénéfice de la culture précédente. Des cultures diversifiées avec des systèmes racinaires différents (un système pivotant comme la betterave suivi d'un système fasciculé comme le blé) permettent d'aller explorer des zones du sol différentes et d'exploiter des ressources dans des horizons variés. La rotation permet de limiter l'inoculum primaire en limitant les débris de culture au sol mais n'influencera pas la sévérité finale de la maladie (Suffert et Sache, 2011).

Deuxièmement, le travail du sol durant l'interculture est important pour la conduite de la culture surtout si on procède à deux cultures de blé successives. Il faut détruire les résidus de culture sur lesquels résident des ascospores. On peut notamment décider de travailler en labourant ses sols (grâce à une charrue à disques ou à soc) qui est le travail conventionnel du sol et permet d'enfouir les résidus de culture. Toutefois, des études ont pu montrer que la sévérité de la septoriose pouvait être légèrement influencée par le labour du sol mais que le développement de la septoriose n'était pas fort corrélé avec les méthodes techniques agronomiques utilisées (Bankina *et al.*, 2015)

Troisièmement, l'utilisation de variétés résistantes est un point clef pour les stratégies de lutte. En effet, le choix d'une variété résistante permet de limiter l'infection car le champignon aura des difficultés à s'installer. Des sources de

résistance quantitative ont également été identifiées mais représentent seulement un pourcentage modéré des résistances aux maladies. Comme déjà vu précédemment, la résistance héritée quantitativement est plus durable dans les conditions de terrain et confère souvent une résistance à large spectre. Il existe de nombreuses variétés de blé d'hiver et leurs niveaux de résistance, leur rendement et leurs caractères culturels sont testés et rapportés dans le « Livre Blanc des Céréales » chaque année au mois de septembre afin que les agriculteurs puissent faire leur choix pour la saison suivante.

Le quatrième point concerne la date et la densité du semis. Un semis précoce (en septembre) risque d'accroître les infections en exposant la culture et les jeunes plantules à la septoriose. Or, l'hiver peut permettre de réduire l'inoculum grâce aux températures froides. Il est donc judicieux de planter lorsque les températures sont plus froides, ce qui est défavorable à l'installation de la maladie comme à partir du mois d'octobre jusqu'à décembre (il est conseillé, selon le Livre Blanc des Céréales, de semer à partir du 10 octobre). La densité de semis est recommandée en fonction de la date de semis et de la variété mais généralement varie entre 250 à 300 grains/ m^2 en sol limoneux. La biomasse aura un effet significatif sur les attaques de septoriose (Jensen et Jørgensen, 2016). La propagation de la maladie sera influencée par l'architecture des plantes et leur densité car l'effet splash des gouttelettes d'eau, emportant les conidies du pathogène, en sera facilité (Vidal, 2017). La conservation d'un environnement plus aéré et un feuillage peu dense aident donc à limiter la propagation des maladies de feuilles en feuilles mais ceci nécessite des compromis avec le rendement.

Enfin, le dernier levier agronomique concerne la fertilisation azotée. Un contrôle de la fertilisation permet de limiter le reliquat azoté après la récolte sans en impacter le rendement et limite ainsi les risques pour l'environnement. Par exemple, les hivers pluvieux peuvent engendrer des pertes d'azote minérale de 25 à 50 kg N- NO_3 par hectare et l'apport d'azote à la sortie de l'hiver sera nécessaire contrairement aux hivers secs. Un ajustement du programme doit se faire chaque année en fonction des reliquats des années précédentes et des conditions climatiques. Le programme de fumure de type 60-60-60 kgN/ha a permis d'atteindre l'optimum économique en 2017. Outre le rendement, l'azote a également un effet direct sur le développement de la maladie (Fleitas *et al.*, 2017). Les champs fertilisés montrent une plus grande progression de la septoriose (Simón *et al.*, 2003) et la fertilisation doit donc être raisonnée. Ensuite, l'application de fongicides sera envisagée lorsque les différentes mesures prophylactiques ci-dessus ne sont pas suffisantes.

I.2.5.2. Lutte chimique

Le contrôle et la lutte contre des pathogènes fongiques reposent sur l'application de fongicides chimiques synthétisés par l'industrie chimique ou de produits alternatifs (des substances naturelles ou des organismes biologiques). En Belgique, les cultures de blé reçoivent en moyenne un à deux traitements par saison. Dans d'autres pays comme l'Angleterre ou l'Irlande, les épidémies de maladies sont tellement sévères qu'elles peuvent nécessiter jusqu'à 4 interventions fongicides. On peut cependant noter que de nombreuses innovations au cours des dernières années au niveau des techniques de pulvérisations et le développement de pulvérisateurs plus performants ainsi qu'un contrôle technique obligatoire tous les trois ans en Wallonie, permettent de diminuer les quantités épandues.

Les matières actives des produits fongicides sont spécifiques ou non à un site cible et visent des processus vitaux pour le champignon (la respiration, la division cellulaire, la biosynthèse des stérols, ...). Elles sont classées selon leur mode d'action et donc leur site cible. Le but de la protection chimique en culture du blé est de protéger les organes verts durant la période de remplissage des grains (Yap et Harvay, 1971). Les parties vertes au-dessus du nœud de la feuille étendard sont responsables de l'accumulation totale de 85% des grains (Watson *et al.*, 1958). Ce sont donc les trois dernières feuilles qui vont remplir le grain et qu'il faut protéger en priorité (Fiche technique d'Arvalis, Institut du Végétal).

Ci-dessous, les différentes grandes familles de fongicides actuellement utilisées dans la lutte contre la septoriose du blé sont détaillées. Les autorisations d'utilisation et de commercialisation des produits chimiques de protection en Belgique se retrouvent sur le site de législations des produits phytopharmaceutiques en Belgique (<https://fytoweb.be/fr>) et sont mis à jour régulièrement.

- **Fongicides multi-sites agréés contre la septoriose**

Les fongicides à action multi-sites ont un effet sur plusieurs mécanismes comme le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire, la β -oxydation des acides gras ou encore la glycolyse. Très efficaces, ils sont toutefois des fongicides de contact contrairement aux fongicides uni-sites qui peuvent ou non rentrer dans la cellule fongique. Leur persistance est donc courte et ils sont rapidement lessivés si des grosses pluies sévissent. Il existe les substances suivantes : le mancozèbe, le manèbe, le folpet et le chlorothalonil. On utilise très peu les deux premières dans le cas du blé. Spécifiquement à la septoriose, c'est le chlorothalonil qui est utilisé lors du

premier traitement en prévention en combinaison avec deux molécules triazoles. Il permet ainsi de renforcer l'efficacité et de retarder l'émergence des résistances.

- **Fongicides uni-sites agréés contre la septoriose**

A. QoI : strobilurines

Les strobilurines, nommées QoI pour « Quinone outside Inhibitors » sont des substances qui empêchent la respiration mitochondriale du champignon. Elles inhibent le site d'oxydation du coenzyme Q située sur la face externe du cytochrome b (complexe III de la chaîne respiratoire). Les matières actives les plus connues sont par exemple l'azoxystrobine ou la fluoxastrobine. Elles sont agréées contre plusieurs maladies des céréales mais n'ont quasi plus aucun effet sur certaines de ces maladies dont la septoriose. Des résistances se sont développées en seulement quelques années (Fraaije *et al.*, 2005) du à la mauvaise gestion de ces uni-sites. Elles étaient tellement efficaces, qu'elles ont été utilisées plusieurs fois par saison et sans être associées dans des mélanges. Une seule mutation ponctuelle (G143A au niveau du cytochrome B) aura été suffisante pour conférer une résistance élevée aux souches de *Z. tritici* (Fraaije *et al.*, 2005 ; Torriani *et al.*, 2009 ; Siah *et al.*, 2010a). Ces matières actives sont donc maintenant utilisées en fin de saison avec un autre mode d'action (comme triazole ou carboxamide) pour lutter contre d'autres pathogènes comme la rouille brune.

B. DMI : les triazoles

Le mode d'action des triazoles (ou DMI pour De-Methylation Inhibitor) cible la biosynthèse membranaire de la cellule fongique et plus particulièrement la protéine stérol 14 α -déméthylase (CYP51) (Siegel, 1981). Il existe différentes matières actives : le cyproconazole, le metconazole, le prothioconazole, le tébuconazole et encore d'autres. On les utilise tout au long de la saison. On pulvérise généralement au stade 32 (échelle BBCH selon Zadoks, 1974), une combinaison de deux triazoles et/ou avec du chlorothalonil pour freiner la septoriose et la garder dans les étages inférieurs. On applique également un deuxième traitement après le déploiement de la dernière feuille (souvent au stade 55 à l'épiaison) avec une triazole et également combiné à une carboxamide (SDHI). Depuis plusieurs années, des souches résistantes émergent au sein des populations de septoriose en Europe et font perdre leur efficacité aux triazoles (Clark *et al.*, 2006; Fraaije *et al.*, 2007). Toutefois, celles-ci restent suffisamment efficaces et utiles contre ce pathogène.

C. DMI : les imidazoles

Les imidazoles ont le même mode d'action que les triazoles et ciblent donc aussi la biosynthèse des stérols. La molécule agréée contre la septoriose est le prochloraz qui est également soumis à l'émergence des résistances mais peu d'informations sont encore connues pour la Belgique (Livre Blanc des Céréales).

D. SDHI : les carboxamides

Les SDHI (Succinate DésHydrogénase Inhibitors) sont des molécules fongicides également nommées les carboxamides. Elles empêchent la respiration mitochondriale des champignons en ciblant la succinate déshydrogénase (Hägerhäll, 1997). Ces molécules sont utilisées depuis seulement une dizaine d'années dans la lutte des pathogènes en céréales mais elles se sont rapidement répandues sur le marché grâce à leur haute efficacité en champs (Sierotzki et Scalliet 2013). Leur mode d'action a été découvert il y a plus de quarante ans mais la première génération de matières actives, qui comprenait l'oxycarboxine et la carboxine, n'agissait que contre certaines maladies, principalement causées par des basidiomycètes (figure 4). Les conditions d'applications étaient compliquées et limitaient leur utilisation. Les SDHI ont donc d'abord protégé les semences, puis la culture du riz et les cultures spéciales. Depuis 2006, elles sont utilisées contre de nombreux pathogènes des céréales. En effet, les nouvelles générations de cette famille sont plus performantes et plus faciles d'application. Elles couvrent des champignons pathogènes comme les ascomycètes et deutéromycètes présents dans des grandes cultures comme les céréales, vignes ou encore les légumes.

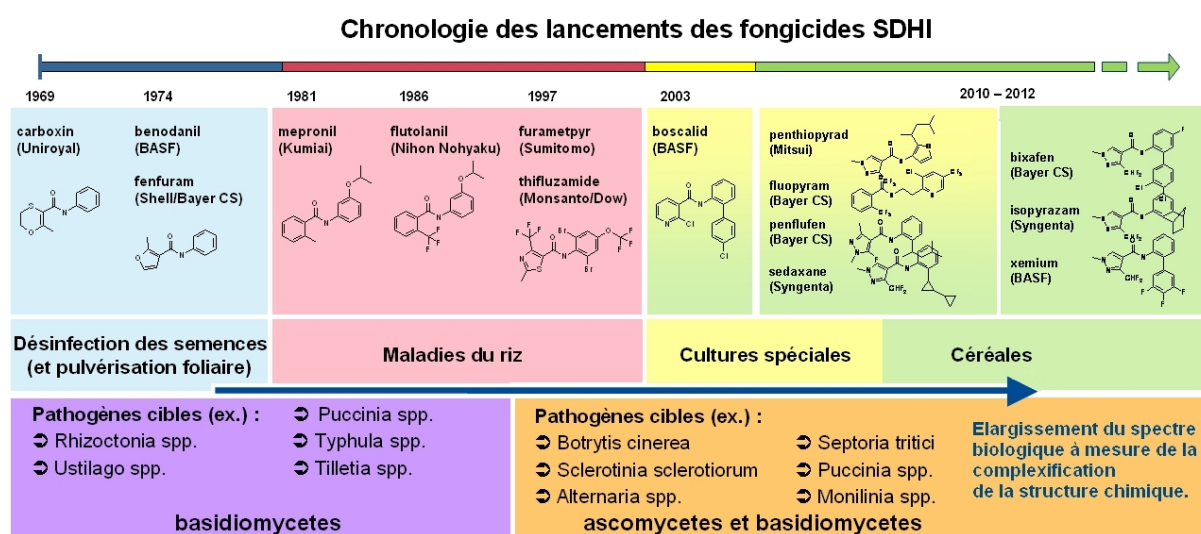


Figure 4: Ligne du temps reprenant l'évolution des lancements de molécules fongicides SDHI et des pathogènes ciblés. Source : Site web Terre-net.

En céréales, les produits SDHI sont généralement utilisés après le déploiement de la dernière feuille (stade 39) en mélange avec une triazole. Les SDHI ont également une action contre l'oïdium, l'helminthosporiose du blé et les fusarioses de l'épi et des feuilles ainsi que sur le piétin-verse. Une liste des produits de lutte contre la septoriose comprenant des molécules SDHI dans leur composition, agréés en Belgique est reprise sur le site Fytoweb (annexe 1) ou dans le Livre Blanc des Céréales (édition 2018). Il faut noter que certains produits sont agréés en Belgique à une dose plus élevée que celle qui est conseillée. Par exemple, pour le produit Adexar, utilisé dans les essais de ce mémoire, la dose agréée est de 2L à l'hectare mais on conseille de l'utiliser à une dose de 1,5L à l'hectare¹¹.

La chaîne respiratoire est formée par plusieurs complexes protéiques qui assurent un transfert de protons et/ou d'électrons et permet la récupération d'énergie à partir de molécules organiques. Les cinq complexes respiratoires sont situés au niveau des mitochondries des cellules. Les fongicides de la famille des SDHI inhibent spécifiquement le fonctionnement du complexe II, la succinate déshydrogénase (SDH). L'enzyme SDH est oxydoréductase membranaire qui catalyse la réaction : Succinate + Ubiquinone $\rightarrow$ Fumarate + Ubiquinol. Elle est constituée de quatre sous-unités (figure 5) protéiques (Stammler *et al.*, 2011). Les sous-unités A et B sont hydrophiles. La sous-unité A comporte le cofacteur d'oxydoréduction FAD (flavine adénine dinucléotide) tandis que la sous-unité B comprend les trois centres fer-soufre : [2Fe-2S], [4Fe-4S] et [3Fe-4S] qui agissent comme des condensateurs grâce à des réactions d'oxydoréductions (Ackrell, 2000; Omura et Shiomi, 2007). Les sous-unités C et D, qui sont quant à elles hydrophobes, comprennent six hélices transmembranaires, un hème b (cofacteur retrouvé notamment dans l'hémoglobine) et un site de liaison à l'ubiquinone (Ackrell, 2000; Sun *et al.*, 2005). Ce complexe enzymatique forme une poche de fixation en trois dimensions pour l'ubiquinone également nommée, le coenzyme Q. Ce sont les 3 sous-unités B, C et D qui forment le site actif de liaison à l'ubiquinone. Les SDHI bloquent la poche de liaison à l'ubiquinone formée et inhibent ainsi le fonctionnement de la SDH (Ulrich et Marthre, 1972). Deux groupes (tableau 1) de structure chimique différente existent au sein de la famille des SDHI : les cis-crotoanilides qui sont les premières apparues dans les années 60 et les méthyl-pyrazole carboxamides arrivées à partir des années 90.

¹¹ Les fongicides agréés pour combattre les maladies cryptogamiques en froment sont repris en détails dans les pages jaunes du Livre Blanc des Céréales et également sur le site de l'asbl CADCO dans les archives « fongicides en céréales ». On y retrouve la liste mise à jour chaque année de tous les produits ainsi que le nombre max d'utilisation par an et par cycle, leur dose agréée, le stade phénologique où l'employer, et la zone tampon ou de dérive. https://www.cadcoasbl.be/p09_biblio/art0002/0705FongEpFroSeiTri.pdf

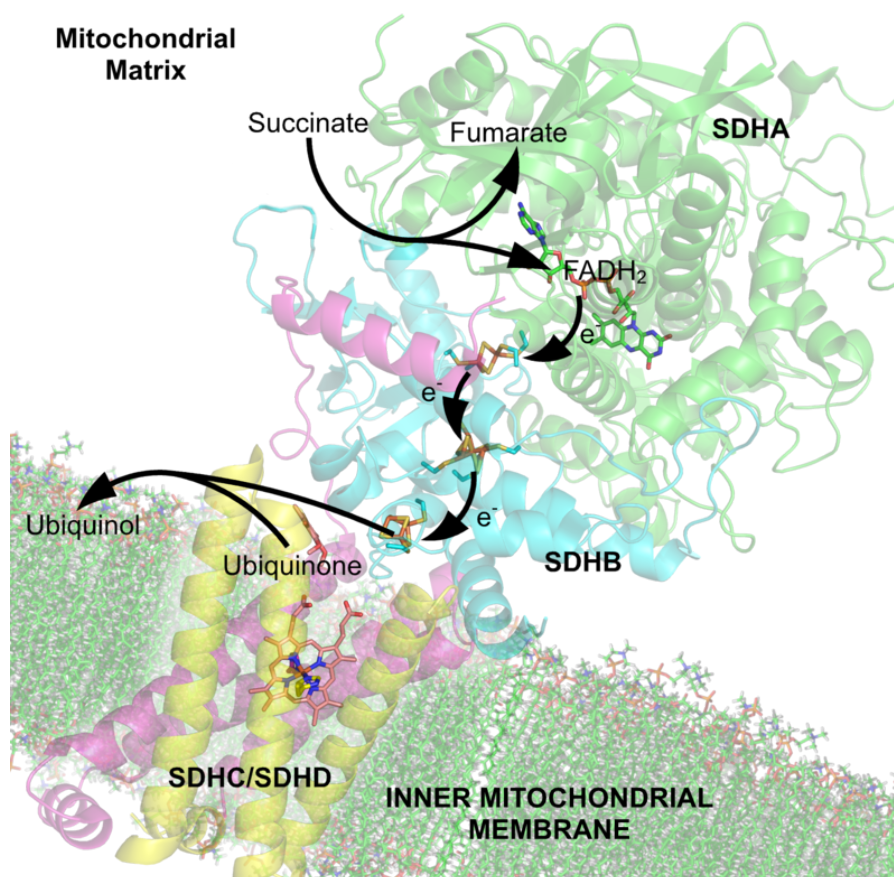


Figure 5: Schéma des flux d'électrons à travers le complexe II illustrant la position des différents cofacteurs : le FAD au niveau du SDH-A, les trois centres fer-soufre au niveau du SDH-B, l'hème et l'ubiquinone au niveau des SDH-C et D. La matrice mitochondriale est en bas (Source : Richard Wheeler).

Tableau 1: Tableau reprenant les molécules des deux groupes de fongicides SDHI utilisés depuis 1966 en Europe (Anne-Sophie Walker, 2011, dans la revue Perspectives agricoles).

Molécules du groupe Cis-crotoanilides	1966 : Carboxine, oxycarboxine (retirés)
	1970-73-79 : Fenfuram / Benodanil / Mépronil (retirés)
	1981 : Flutalonil (en p-d-t)
	1990 : Triluzamide
	2007 : Boscalid
	2010 : Fluopyram
Molécules du groupe Méthyl-pyrazole carboxamides	1990 : Furamethpyr
	2010 : Isopyrazam
	2011 : Sedaxane, Bixafen, Penthiopyrad et Fluxapyroxad
	2012 : Penflufen

Les fongicides sont classés par mode d'action selon le Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) et les SDHI ont le code n°7. Ce comité d'action est un organisme regroupant les principales compagnies productrices de fongicides et propose des recommandations pour prolonger la performance des produits et conserver l'efficacité des molécules encore disponibles sur le marché. Contrairement aux fongicides multi-sites qui ont plusieurs sites d'actions, les SDHI agissent sur une seule cible. Ils sont plus susceptibles de développer des résistances dans les populations de champignons avec lesquelles ils interagissent. Leur risque d'apparition de résistance a été classé comme « moyen à fort » par le FRAC.

- **Produits alternatifs**

Les produits alternatifs sont composés de substances naturelles ou d'organismes biologiques. On peut mentionner le seul produit d'organismes biologiques agréé en Belgique employé contre la septoriose du blé qui est le CERALL (Fytoweb). C'est une suspension de bactéries (*Pseudomonas chlororaphis*) autorisée dans le traitement des semences de blé. En ce qui concerne les substances naturelles, le soufre est autorisé en blé et peut être employé en agriculture biologique. On peut aussi mentionner les purins d'orties qui sont réputés pour avoir un effet d'éléciteur des défenses naturelles. D'autres produits comme des pulvérisations de décoctions de prêle sur les feuilles, qui ont une forte teneur en silice, induisent un effet fongistatique mais leur composition est irrégulière. L'emploi d'huiles essentielles est également en cours de recherche dans les universités. L'emploi de métabolites secondaires produits par *Bacillus subtilis* comme la mycosubtiline a montré des effets en laboratoire contre la septoriose et l'équipe de recherche de Kildea (2008) mentionne un potentiel bio-contrôle par *Bacillus megaterium*. Enfin, une récente étude sur l'activité antifongique du houblon contre ce pathogène mentionne que l'extrait brut de houblon et l'huile essentielle ont significativement diminué la croissance fongique (Bocquet *et al.*, 2018). Toutefois, la recherche de bio-fongicides pour lutter contre ce pathogène est difficile et le manque d'efficacité du contrôle alternatif nous contraint à choisir les produits synthétiques sans autre choix pour le moment.

Pour conclure ce point sur les stratégies de lutte contre la septoriose nous pouvons mentionner également l'aide proposée aux agriculteurs. Des nombreux outils pratiques existent pour épauler les agriculteurs dans leur programme de protection. Cela permet de les avertir des risques liés à la pression de la maladie et de les conseiller en matière de choix des traitements afin de limiter leur mauvaise utilisation ou en cas de faible risque parasitaire. En région wallonne, le CePiCOP « Centre Pilote wallon des Céréales et Oléo-Protéagineux » diffuse des informations et avertissements émis par le CADCO au cours de l'année selon 3 axes d'action (phytotechnie, ravageurs et champignons) afin de mieux informer les agriculteurs.

Des observations sont effectuées dans des champs de référence par des experts au cours de la saison afin d'établir des avis de la situation réelle. L'utilisation du logiciel de prévisions « Proculture » permet de simuler le développement de la maladie en fonction des conditions climatiques. Les particuliers peuvent ensuite extrapoler les recommandations à leurs propres parcelles. Un outil de gestion du risque similaire « Septo-LIS »¹² est utilisé en France pour déclencher le premier traitement et décider du nombre de traitements nécessaires. L'amélioration des outils de prévision en fonction de plus de variables climatiques¹³ permettra, dans un futur, de mieux éclairer la prise de décision à la parcelle et prévoir des traitements adaptés à chaque champ cultivé. La protection contre les maladies fongiques est un réel défi pour conserver les rendements en blé de nos régions.

Les changements climatiques futurs vont sans doute bouleverser la croissance des plantes et le cycle des maladies. Il est donc important d'intégrer dans nos mesures de protection, l'incidence du changement climatique (Ghini *et al.*, 2008). Dans le cas de *Z. tritici*, l'architecture de la plante est un facteur qui influence les épidémies et les plantes hautes sont moins attaquées par la septoriose (Simón *et al.*, 2005). Une extension rapide de la tige suite aux hausses de températures pourrait entraîner des différences dans la propagation verticale de la maladie et limiter l'infection (Pielaat *et al.*, 2002)

¹² Outil Septo-LIS <http://www.septolis.arvalisinstitutduvegetal.fr/>

¹³ Projet AGROMET : construction d'une plateforme web opérationnelle destinée à la diffusion en temps réel de données agro-météorologiques à haute résolution spatiale (1 km²) et temporelle (horaire) <http://www.cra.wallonie.be/fr/agromet>

I.3. RÉSISTANCE AUX FONGICIDES

I.3.1 Mécanismes des résistances

L'application des produits chimiques, même si elle est surveillée, entraîne une pression de sélection sur les organismes nuisibles et engendre des mécanismes de résistance. Le FRAC définit la résistance comme une réduction héréditaire acquise de la sensibilité d'un champignon à un agent antifongique (ou fongicide) spécifique (<http://www.frac.info/resistance-overview/>). D'autres sources préfèrent parler de sensibilité réduite (Delp et Dekker, 1985). Cela fait plus de 200 ans que les fongicides sont utilisés pour protéger nos cultures (Brent, 1995). Les premiers documents relatant un phénomène de résistance ne datent que des années 1960 avec un premier cas de sensibilité réduite aux hydrocarbures chez les espèces *Penicillium* (Brent, 2012). On peut également constater à cette même période une diminution de la sensibilité aux fongicides organomercurels chez l'agent *Pyrenophora avenae* sur l'avoine (Noble *et al.*, 1966). Mais ce n'est qu'à l'apparition des fongicides à action spécifique dans les années 70, que le phénomène de résistance a pris de l'élan. De manière générale, quatre mécanismes différents conduisent à la résistance aux fongicides (figure 6).

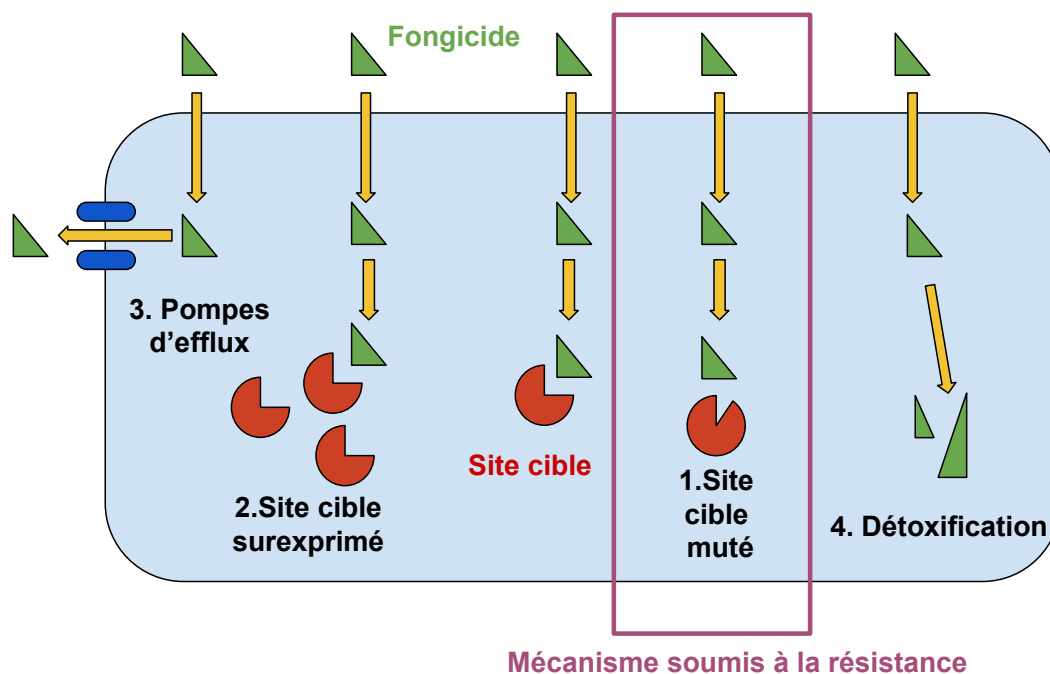


Figure 6 : Schéma représentant les mécanismes de résistance des fongicides uni-sites.

1. Mutation au niveau du site cible

Lors du processus de réplication de l'ADN, des erreurs nommées plus communément mutations peuvent apparaître aléatoirement. Ces mutations peuvent dans certains cas rares se situer au niveau des gènes codant pour le site ciblé par un produit fongicide (ex : le gène codant pour la SDH dans le cas des produits SDHI). En conséquence la mutation peut entraîner une modification de la séquence d'acides aminés et modifier la structure ou la forme du site ciblé par le fongicide. Ces mutations ont une fréquence de 1 sur 1000 millions (Brent et Hollomon, 2007). Si le changement est minime, le produit reconnaît toujours le site cible. Si la forme devient trop différente alors il ne le reconnaît plus et cela entraîne une perte d'efficacité de produit fongicide. Le champignon devient résistant au produit. Les souches sensibles seront éliminées par la pulvérisation du produit en limitant les dégâts en champs mais en laissant survivre et se multiplier les quelques souches résistantes. Dès lors les fongicides empêchent la survie de la majorité des individus et révèlent la faible proportion de souches naturellement mutées et résistantes. Elles seront ainsi en plus grande proportion dans la population (Brent et Hollomon, 2007). Au fil des pulvérisations, cette proportion augmente jusqu'à ce que la population contienne assez d'individus résistants pour poser un problème.

Ce premier mécanisme est le plus couramment rencontré. Les fongicides uni-sites comme les strobilurines (QoI), les carboxamides (SDHI) ou les triazoles et imidazoles (DMI) sont plus sujets à l'apparition de résistances contrairement à des multi-sites comme le chlorothalonil. Des mutations dans plusieurs cibles devraient être cumulées pour développer une résistance aux produits multi-sites. Les uni-sites ont l'avantage d'être capables de pénétrer dans la feuille et les cellules fongiques contrairement aux multi-sites qui sont souvent des substances de contact, agissant avant l'infection et dont la rémanence est plus faible. La distribution des niveaux de sensibilité peut être différente en fonction des familles de fongicides. Une seule mutation peut conférer une résistance élevée comme dans le cas des strobilurines (QoI) face à l'agent *Z. tritici* (mutation G143A au niveau du cytochrome B). On a dès lors une distribution bimodale avec deux populations distinctes : une population résistante et l'autre sensible. En cas contraire, on a une distribution unimodale lorsque plus d'un allèle est impliqué dans le mécanisme de résistance. C'est le cas des composés azolés qui montrent une population avec des niveaux de résistance progressive. De plus, les produits azolés ont une résistance croisée incomplète entre les différents produits (Clark, 2006). Une résistance croisée élevée est démontrée entre le cyproconazole et le propiconazole (Sykes *et al.*, 2018). Une résistance modérée est constatée entre le prothioconazole et le tébuconazole (Sykes *et al.*, 2018). Les mécanismes de résistance des triazoles comprennent des altérations du gène CYP51 avec plus de 30 mutations différentes déjà rapportées (Cools *et al.*, 2013).

L'étude de Leroux *et al.* (2010) a montré que des souches (isolées en France en 2009) résistantes aux triazoles étaient également résistantes à d'autres fongicides (les QiI). Ceci suggère une résistance multiple MDR (multi-drug resistance) à plusieurs familles de fongicides. Des mécanismes de surexpression de pompes à efflux seraient responsables de cette MDR.

2. Surexpression de la cible

La surexpression de la cible diminue l'efficacité du produit. Le fongicide est en concurrence avec le substrat naturel de la cible. Si ce dernier est surexprimé, le fongicide ne pourra plus se lier avec tout ce qui est produit par le site cible. La dose de fongicide devra être augmentée si on veut rétablir l'équilibre mais cela n'est pas toujours possible (dose maximale autorisée). La surexpression du gène CYP51 confère des résistances aux molécules azolées et les altérations dans les régions de régulation du gène ont déjà été rapportées pour la septoriose (Leroux et Walker, 2011).

3. Systèmes à efflux

Les pompes à efflux vont expulser en dehors de la cellule des substances qu'elle considère comme toxiques ou étrangères. Ces pompes à efflux existent de manière naturelle dans les cellules fongiques. Les plus courantes chez les champignons sont les transporteurs ABC (ATP binding cassette) et MFS (Major Facility Superfamily). Certaines publications parlent des résistances multiples dues à des transporteurs MFS capables d'expulser plusieurs fongicides de différents groupes (Roohparvar *et al.*, 2007). Chez *Botrytis cinerea*, des isolats qui contenaient ces pompes étaient plus fréquemment retrouvés dû à la pression des fongicides (Kretschmer *et al.*, 2009). Ils entraîneraient de grandes pertes d'efficacité vu qu'ils favoriseraient la sortie de tous composés toxiques ou fongicides à l'extérieur de la cellule fongique. La découverte récente de l'insertion de 519 pb (paire de bases) dans la région promotrice du gène MgMFS1 chez *Z. tritici* montre une diminution de la sensibilité à divers fongicides (Omrane *et al.*, 2017). Une régulation à la hausse est provoquée par cet insert et serait responsable d'une résistance multiple aux fongicides azolés particulièrement et aux SDHI dans une moindre mesure (Omrane *et al.*, 2017). Mais toutefois, des souches qui ne contiennent pas l'insert sont résistantes et des études doivent encore confirmer ce mécanisme.

4. Détoxification des molécules

Le dernier mécanisme de résistances fait intervenir le métabolisme fongique. Il va détoxifier les molécules fongicides en une forme non-toxique qui n'est plus

nuisible pour l'organisme et donc plus efficace. Ce mécanisme a été rencontré chez les mauvaises herbes et les insectes avec la détoxification du pesticide par des enzymes métaboliques comme le cytochrome P450 ou la glutathion transférase (Cummins *et al.*, 2013) mais il semblerait que ce ne soit pas un mécanisme rencontré chez les fongicides. Un seul rapport sur la dégradation d'un fongicide QoI par l'activité estérasique a été rapporté (Jabs *et al.*, 2001) mais semble avoir peu d'impact sur la résistance au champ.

I.3.2 Facteurs clés dans le développement des résistances

Les risques de résistance divergent en fonction de l'agent et du type de fongicide. Des études ont estimé un risque global de résistance face à différents agents pathogènes et aux systèmes de production en fonction de différentes classes chimiques (Kuck et Russel, 2006). Des tests de sensibilités sur plaques multi-puits sont souvent réalisés afin de caractériser la sensibilité par une valeur relative d'EC50. L'EC50 d'une souche est la dose de fongicide qui inhibe la croissance de la souche à 50% comparativement à un témoin qui n'est pas traité au fongicide (FRAC). Plus une valeur d'EC50 est grande, plus la dose est élevée pour réduire la croissance de l'agent. Ainsi, on déduit facilement que les souches qui admettent des valeurs d'EC50 élevées sont celles qui sont les plus résistantes. On peut regrouper les facteurs influençant la résistance en 3 catégories : biologiques, génétiques et opérationnelles (rapport de la FAO 2013, « Resistance Management Guidelines »).

1. Les facteurs biologiques

La taille de la population du pathogène va être un élément majeur dans le processus de développement des résistances. Plus la population est grande, plus le nombre d'individus est élevé et le nombre de survivants aussi. Elle va également influencer le nombre d'individus susceptibles de muter (Brent et Hollomon, 2007). Le potentiel reproductif est également important avec la présence d'un mode sexuel de reproduction et un nombre élevé de descendants. Le renouvellement générationnel rapide avec des périodes de latence courtes favorise les résistances en permettant plusieurs générations de pathogènes par an. La dispersion du pathogène et donc des souches résistances influence leur fréquence. La capacité du pathogène d'infecter tous les stades de son hôte entraîne un plus grand nombre de pulvérisations de fongicides. Une gamme d'hôtes plutôt large ou étroite (Van den Bosch *et al.*, 2014) influence les risques de résistances. Enfin, le mode d'action et le nombre de sites cibles du fongicide va favoriser ou non l'apparition de résistance.

2. Les facteurs génétiques

Le degré de résistance sera plus grand si plusieurs mécanismes de résistances sont impliqués comme des mutations dans le site cible ainsi qu'un mécanisme de pompes. Les souches qui portent un gène résistant peuvent voir leur valeur adaptative pénalisée. Elles peuvent subir une vigueur diminuée ou une différence dans le cycle de vie (la période de latence par exemple). Il peut aussi y avoir des phénomènes de résistance croisée lorsqu'une mutation procure une résistance à plusieurs molécules.

3. Les facteurs opérationnels

Les fongicides à large spectre d'activité comme le cas des DMI et des QoI sont utilisés pour le contrôle de plusieurs agents pathogènes. Ils seront plus susceptibles de développer des résistances par le simple fait qu'ils seront fortement utilisés. Le taux d'applications et la dose ainsi que le stade de vie traité influenceront l'émergence des résistances.

I.3.3 Gestion du risque d'apparition des résistances

En analysant les facteurs clefs, on peut estimer le risque d'apparition des résistances en envisageant aussi des similitudes entre des pathogènes ou des modes d'actions similaires des fongicides.

Le risque tient compte alors (Brent et Holloman, 2007a) des :

- A. Caractéristiques du fongicide : le site cible, la classe du fongicide, la réponse du pathogène à des applications répétées, la réponse à des expériences de mutagenèse,...
- B. Caractéristiques du pathogène : le temps de reproduction, le degré et la dispersion des spores, l'historique de la résistance, ...
- C. Conditions d'utilisation : les applications (fréquences, doses,...), l'incidence de la maladie et l'isolement du pathogène (en serres ou plein champ).

Des pratiques, proposés par le FRAC (Monographie n°3, Russel, 2003¹⁴) ou l'IOMC¹⁵ (rapport FAO 2013), permettent de retarder l'apparition des résistances.

¹⁴ <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-3.pdf>

¹⁵ Programme inter-organisation pour une gestion rationnelle des produits chimiques.

Pour les molécules SDHI, il convient de :

- Pulvériser uniquement sous forme de mélange avec un partenaire (triazole par exemple). Le mélange de deux molécules fongicides permet d'assurer un contrôle de la maladie tout en limitant le risque de résistances. Il augmente ainsi la durée d'efficacité des deux partenaires comparés à leur utilisation seule (Hobbelen *et al.*, 2013). Toutefois, Mikaberidze *et al.* (2015) montrent dans leur étude que si les coûts de la valeur adaptative sont absents, le fongicide à haut risque du mélange sélectionne quand même de la résistance.
- Choisir un partenaire qui a un contrôle efficace lorsqu'il est employé seul et doit avoir un mode d'action différent.
- Limiter l'emploi des SDHI à préférentiellement une, voire deux applications par saison culturale.
- Les SDHI peuvent être utilisées tôt dans le cycle de la maladie dans une fonction préventive ou pas uniquement pour leur action curative. L'utilisation du produit comme prophylaxie permet d'agir avant que plusieurs lésions ne soient formées et maintient une population faible du pathogène. Toutefois, il est conseillé d'appliquer les produits contenant une carboxamide après le déploiement de la dernière feuille (stade 39) pour profiter de la longue rémanence de ce type de molécule (Bataille *et al.*, Livre Blanc Céréales de 2018)

Toutes les stratégies de gestion des résistances ont pour but de les ralentir tout en conservant le contrôle de la maladie. L'évaluation de plusieurs pratiques permet de mieux connaître celles qui limitent leur émergence. Une limitation des quantités pulvérisées peut être une de ces pratiques. Elle peut se faire de deux manières : soit on diminue les doses, soit on diminue le nombre de pulvérisations. De nombreux débats ont vu le jour avec les réductions de doses. On craignait de laisser certaines souches résistances lors de l'emploi de doses incomplètes comme dans les cas vus chez les antibiotiques et les bactéries humaines. Seulement, le constat n'est pas le même pour les fongicides. Contrairement aux insectes, mauvaises herbes et mammifères qui sont des organismes diploïdes, l'agent *Z. tritici* et de nombreux champignons pathogènes sont haploïdes. Les populations diploïdes comprennent des individus hétérozygotes et l'application d'une pleine dose permet d'éliminer ces individus (Van den Bosch *et al.*, 2011). Mais pour les individus haploïdes, la pleine dose est donc moins pertinente. Nombreuses études (Hobbelen *et al.*, 2013 ; Van den Bosch *et al.*, 2011) se mettent d'accord sur le fait que les doses plus élevées sélectionnent plus de résistance. Mavroeidi et Shaw (2006) ont montré que la

sélection de la résistance dans le cas d'une triazole augmentait de manière proportionnelle avec la dose. Dooley *et al.* (2015) ont montrés que la réduction de moitié de la dose recommandée n'avait aucun effet sur la sélection des résistances. La réduction de la dose d'application d'un produit est même devenue une pratique courante chez les agriculteurs depuis que le comité d'agrément l'a autorisée. Il existe sans doute une combinaison optimale entre le nombre d'applications et le dosage adapté à l'année qui permettrait un contrôle efficace de la maladie et une durée de vie plus longue pour les produits employés (Van den berg *et al.*, 2016). Toutefois, la réduction de la dose est souvent synonyme de réduction du contrôle de la maladie (Bataille *et al.*, Livre Blanc Céréales de 2018). Ainsi, les années à forte pression parasitaire, une réduction de la dose pourrait compromettre les rendements. Les rapports annuels d'Arvalis, Institut du Végétal, ont de nombreuses fois mentionné qu'il faut ajuster la dose en adéquation avec la nuisibilité de l'année et le positionnement du produit.

Prédire les apparitions de résistances à un produit fongicide s'avère utile pour prévenir les diminutions de son efficacité. Une meilleure compréhension de phénomènes de résistance dans chaque région permet de mieux utiliser les fongicides. Plusieurs approches ont déjà été utilisées pour prédire les mutations en augmentant leur fréquence de manière artificielle. Tout d'abord, la technique de mutagenèse UV ou chimique combinée avec une sélection forte en fongicides permet de créer des souches mutées résistantes. Par exemple, les mutations dans les codons 225 et 272 de SDH-B qui avaient été générées *in vitro* par mutagenèse, ont été retrouvées ensuite sur le terrain chez *B. cinerea* (Leroux *et al.*, 2010). En revanche, les mutations générées en laboratoire ne sont pas toujours retrouvées dans les souches de terrain. Un point à prendre en compte lors de cette mutagenèse artificielle est le coût de la valeur adaptative des souches et la pénalité que certaines mutations entraînent (Avila-Adame et Köller, 2003). En effet, les mutants générés en laboratoire sont souvent isolés dans des conditions très contrôlées sur des milieux de culture alors que, dans les conditions réelles du champ, certaines mutations n'auraient pas pu se développer à cause de leur faible compétitivité face aux autres souches ou de leur sensibilité aux conditions climatiques. Outre la mutagenèse, des évolutions parallèles entre les champignons peuvent permettre de prédire les résistances. Une résistance mentionnée pour un champignon face à un produit fongicide peut prédire un phénomène similaire pour le même produit chez d'autres pathogènes fongiques. La mutation G143A conférant la résistance aux QoI avait été signalée pour la première fois chez *Erysiphe graminis f. sp. tritici* en 1998 (Sierotzki *et al.*, 2000) et a été rapportée par la suite chez plus de 20 espèces différentes. Les prévisions seront d'autant plus faciles si les interactions épistatiques sont connues et simples. A l'inverse, si elles sont complexes et plus subtiles avec de multiples mutations, comme

pour les fongicides azolés (Cools *et al.*, 2013), la prévision d'évolution des résistances sera plus difficile à faire.

I.3.4 Situation des résistances aux SDHI en Europe

A ce jour, plusieurs mutations au niveau du gène SDH ont été rapportées dans 14 champignons différents et affectent leur sensibilité (Sierotzki et Scalliet, 2013). Depuis l'arrivée des nouvelles molécules SDHI sur le marché des céréales, un suivi de l'évolution des résistances est réalisé dans plusieurs pays (Irlande, UK, France). En effet, les leçons du passé, avec une perte totale d'efficacité des strobilurines (QoI) en seulement quelques années et un déclin de la sensibilité aux triazoles, ont amené à rester vigilants pour la protection du blé contre la septoriose.

Les résultats du rapport de surveillance de 2017 par les membres du FRAC (www.frac.info/ SDHI Working Group Minutes, 2017) révèlent que la majorité des souches de septoriose sont encore sensibles aux SDHI. Les produits SDHI conservent donc à l'heure actuelle une bonne efficacité au champ. Des souches présentant des résistances faibles à élevées ont toutefois été identifiées dans certains pays à de basses fréquences. Sur le terrain, deux souches montrant une faible résistance ont été retrouvées en 2012 : une souche avec la mutation C-T79N en France et une autre avec C-W80S au Royaume-Uni. D'autres souches montrent une légère résistance aux SDHI et sont retrouvées depuis 2012 (Dooley, 2015) en Irlande ou à plus basse fréquence en Allemagne du Nord, au Royaume-Uni, aux Pays-Bas et encore à une moindre fréquence en France ou en Belgique. Les isolats admettent les mutations suivantes dans les 3 sous-unités B, C et D du gène SDH : B-T268I/A, B-N225I, BR265P, C-T168R, C-T79I, C-R151S/T/M, C-N86S/A, C-V166M, D-I50F et D-M114V. Des mutations C-H152R et SdhD-R47W retrouvées dans la séquence de souches isolées en 2015 (Dooley *et al.*, 2016) en Irlande confèrent quant à elle un niveau élevé de résistance. La mutation C-H152R a été détectée pour la première fois en champs en Italie et aux Pays-Bas en 2016 et de nouveau en 2017 en Irlande et au Royaume-Uni et pour la première fois en Allemagne. Cette mutation est toutefois rencontrée à une faible fréquence en Europe. Le mutant C-H152R avait déjà été généré en laboratoire en 2005 sur un milieu YBG Agar contenant 50 ppm de boscalid et sans mutagénèse aux UV's (Rehfus *et al.*, 2017). D'autres mutations C-N33T, C-N34T ont été rapportées plusieurs fois mais elles ne semblent pas associées à la résistance des souches. Auparavant, des souches de *Z. tritici* produites en laboratoire par mutagénèse avaient été mentionnées (Skinner *et al.*, 1998) comme admettant une résistance au boscalid et à la carbinoxamine et admettaient les mutations H267L et H267Y dans la sous-unité B.

L'étude de Dooley *et al.* (2016) révèle que la sensibilité médiane de la population de 2015 était deux fois moins sensible que la population de référence nommée baseline (une population formée de souches de 2005 à 2010) face à la molécule penthiopyrade (figure 7). Les souches ont suivi les mêmes tendances pour les autres molécules SDHI testées (bixafen, boscalid, fluxapyroxad et isopyram) à l'exception du fluopyram qui n'a pas suivi la même tendance. Les résultats de l'équipe de recherche de Kildea (figure 8), montrent une augmentation des valeurs de logEC₅₀ testé au fongicide isopyram et confirment ainsi une diminution de la sensibilité de la population de *Z. tritici* en Irlande depuis l'année 2011 jusqu'à aujourd'hui.

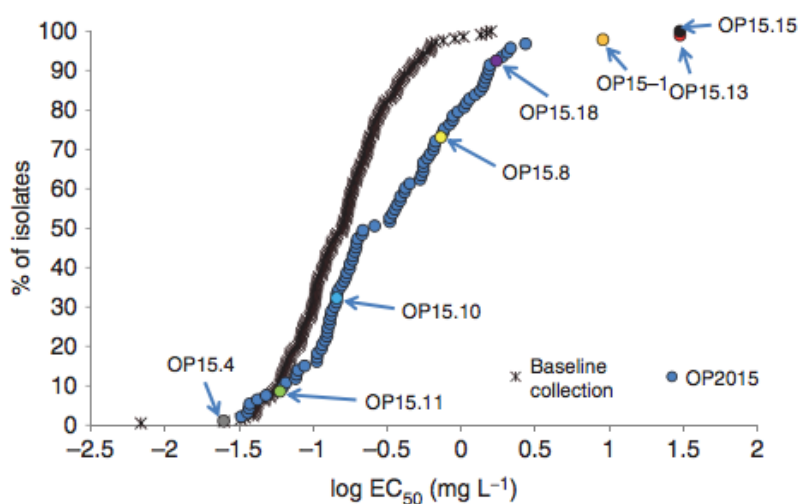


Figure 7 : Distribution de la sensibilité des souches « baseline » (2005 à 2010, N=209) et de 2015 (N=93) face au penthiopyrade (Dooley et al., 2016).

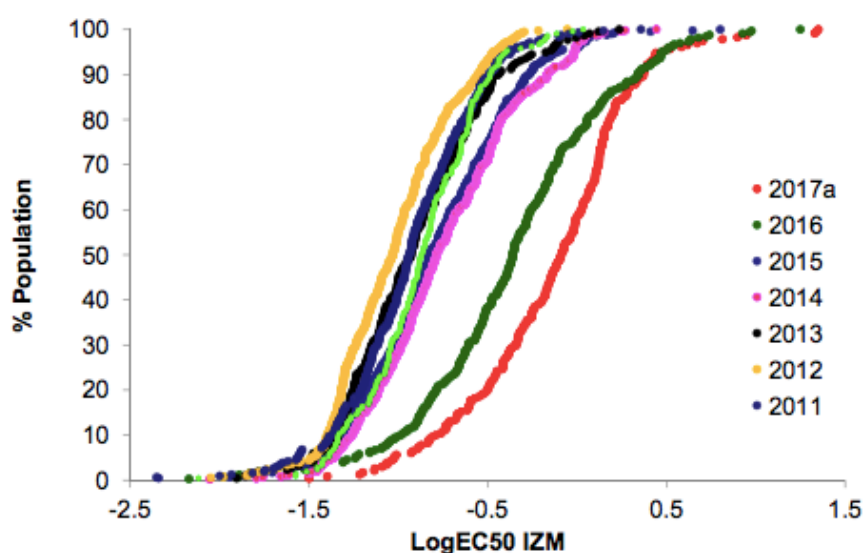


Figure 8 : Distribution de la sensibilité des souches de la population de *Z. tritici* en Irlande correspondant aux valeurs de LogEC₅₀ testées au fongicide isopyram au fil des années 2011 à 2017. Source : Kildea courtesy

L'étude de Rehfus et al. (2017) compare 4 souches de *Z. tritici* isolées en champs caractérisées par diverses mutations dans le gène cible des SDHI et une souche témoin (WT) (figure 9). Le pourcentage d'inhibition de chaque souche a été examiné pour plusieurs fongicides. La souche contenant la mutation C-H152R confère la résistance la plus élevée à tous les fongicides testés. Les souches ayant les mutations B-T268I, C-T79N et C-N86S ont des comportements flexibles selon les matières actives mais sont généralement moyennement sensibles aux différents fongicides testés.

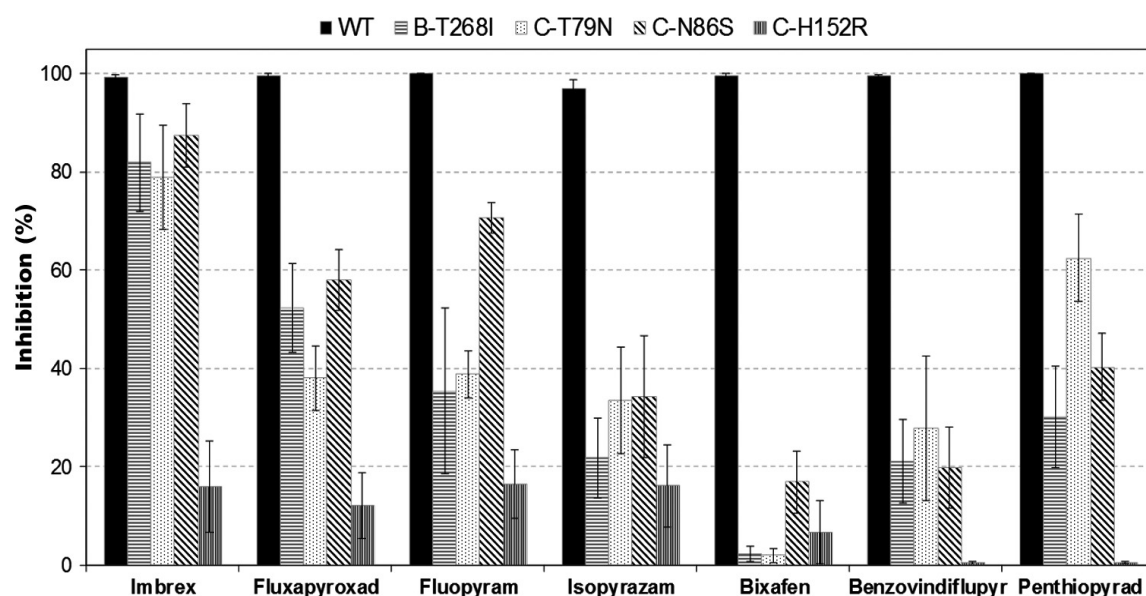


Figure 9 : Efficacité de différentes molécules SDHI sur des isolats *Zymoseptoria tritici* dont le gène de la succinate déshydrogénase est de type sauvage ou avec les substitutions d'acide aminé B-T268I, C-T79N, C-N86S et C-H152R. Adapté de l'article Rehfus, 2017

Toutefois, ces souches pourraient ne pas se propager. Scalliet *et al.* (2012) ont pu démontrer que la mutation SdhC-H152R n'affectait pas la capacité des souches de *Z. tritici* mutées en laboratoire à infecter et provoquer la maladie mais ont rapportés une réduction de son activité enzymatique. La valeur adaptative de SdhD-R47W reste encore à déterminer. Bien que les faibles fréquences de ces souches soient encourageantes pour la durabilité de l'efficacité de ces fongicides, les résultats prouvent que la pression fongicide sélectionne des résistances. Cette notion de valeur sélective est une information importante dans la gestion de la résistance aux fongicides car elle permet de mesurer la capacité d'adaptation et de survie d'une souche comparativement à d'autres souches de la population dans les mêmes conditions.

Des souches hautement résistantes au fluopyram (avec des valeurs d' $EC_{50} > 5,0$ mg/ L) ont été détectées à des fréquences basses, entre 2,2% et 11,1%, dans les populations échantillonnées à partir de 2010. L'origine de la baisse de sensibilité de

ces souches n'a pas pu encore être déterminée car les mutations C-N33T et C-N34T retrouvées ne sont pas responsables des phénomènes de résistance et aucune autre mutation dans les 4 sous-unités SDH n'a pu être détectée. L'hypothèse de surexpression du site a été mise à l'écart car cette surexpression devrait impacter toutes les molécules SDHI et pas uniquement le fluopyram. D'ailleurs, des études ont été réalisées afin de connaître l'existence de résistances croisées entre les molécules SDHI. Pour rappel, la résistance croisée est un phénomène qui se produit lorsque la résistance à un fongicide se traduit par une résistance à un autre fongicide également (FRAC). Des résistances croisées avaient déjà été mentionnées pour les produits azolés et les strobilurines. Le même phénomène est donc susceptible d'exister pour les différentes molécules fongicides de la classe des SDHI qui sont aussi des fongicides uni-sites. Ces schémas de résistances croisées sont complexes car certaines mutations entraînent des résistances croisées complètes tandis que d'autres non (Scalliet *et al.*, 2012). Yamashita et Fraaije (2018) ont pu affirmer une résistance croisée positive entre le fluopyram et l'isofétamide¹⁶, mais pas avec d'autres SDHI. La résistance croisée incomplète du fluopyram par rapport aux autres molécules a également été rapportée dans une autre étude (Dooley *et al.*, 2016). La résistance à ces deux fongicides a été détectée dans des extraits mitochondriaux et certains transporteurs ABC sont situés au niveau des mitochondries. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de trouver l'origine des résistances pour le fluopyram et l'isofétamide. Il existe également une résistance croisée entre la pyridine (boscalid) et les pyrazoliques carboxamides (bixafen, fluxapyroxad et penthiopyrade) mais le nombre de données est peu élevé et pas suffisant pour confirmer ce résultat.

Pour conclure cette revue bibliographique, rappelons que les fongicides jouent encore un rôle clef dans la protection contre l'agent de septoriose, *Z. tritici*, en Belgique. La lutte chimique semble avoir encore de l'avenir dans nos stratégies de lutte mais elle est sous haute surveillance et sous de nombreuses pressions politiques, sociales et environnementales. La législation européenne stricte réduit d'année en année le nombre et la diversité des molécules fongicides (Hillock et Cooper, 2012). Nos stratégies sont donc plus limitées et moins flexibles. Dans une période où la pression des pathogènes fongiques ne diminue pas et augmente même (Fisher *et al.*, 2012), une organisation européenne est nécessaire pour répondre aux défis d'une production agricole durable et d'une sécurité alimentaire. La sélection variétale, les innovations biotechnologiques ainsi que des programmes fongicides peuvent répondre à certaines attentes. Finalement, l'amélioration des connaissances sur les résistances permettra de mettre en place une meilleure stratégie de protection des cultures de blé et c'est dans ce dernier volet que s'inscrit ce mémoire.

¹⁶ Aucun produit à base d'isofétamide n'est autorisé en Belgique.

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le plan expérimental comprend six étapes et est présenté sous forme d'un diagramme simplifié (figure 10). La première étape consistait à l'échantillonnage des feuilles de blé présentant des symptômes de septoriose dans des parcelles expérimentales ayant subi des programmes de traitements fongicides choisis. Ensuite, à partir de ces feuilles, des isollements mono-conidiens de *Z. tritici* ont été réalisés afin de générer une collection de souches belges génétiquement pures¹⁷. La sensibilité des souches à 2 molécules SDHI, le fluopyram et le fluxapyroxad, a été évaluée à l'aide de la mesure de leur valeur EC50. Les résultats de ces tests de sensibilité ont permis de sélectionner les souches présentant un niveau de résistance élevée. Le séquençage de ces dernières au niveau du gène cible du fongicide, le gène SDH, a permis d'observer des potentielles mutations qui sont susceptibles d'être à la base de la résistance observée. Ensuite, une sélection de 25 souches a été inoculée sur des plantules de blé de 4 variétés afin de mesurer des composantes d'agressivité des souches en fonction de leur résistance. Finalement, les résultats obtenus ont été traités statistiquement afin de valider les hypothèses et d'émettre les conclusions.

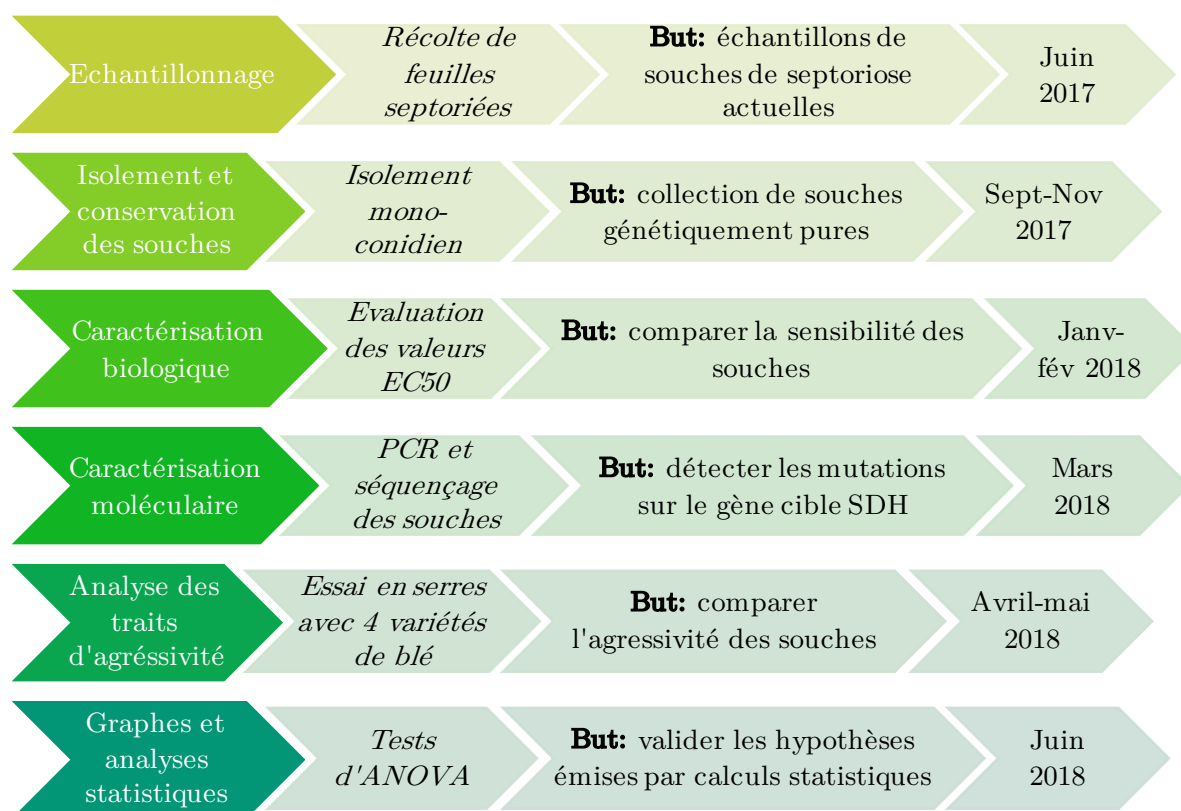


Figure 10: Schéma expliquant les 6 étapes expérimentales mises en place lors de ce mémoire.

¹⁷ Une souche génétiquement pure est produite à partir de la descendance d'une seule et unique conidie et est donc génétiquement homogène.

II.1. ÉCHANTILLONNAGE EN CHAMPS EXPÉRIMENTAUX

Un réseau d'essais fongicides (Réseau d'essais fongicides wallons) en céréales est mis en place depuis 5 ans en Wallonie par quatre partenaires : le CRA-W, Gembloux Agro-Bio Tech, le CPL-VEGEMAR et le CARAH. Ce réseau compte 4 objectifs principaux. Le premier objectif est l'évaluation chaque année des performances des programmes fongicides. Le second est la validation des avis CADCO. Le troisième est l'élaboration d'une base de données solide pour le développement d'un outil d'aide à la décision (OAD) adapté à la parcelle. Et enfin, le dernier objectif est l'évaluation des niveaux de résistance de la septoriose aux fongicides et l'identification de pratiques limitant la sélection de souches résistantes.

Les souches de septoriose utilisées dans ce mémoire proviennent d'échantillons de feuilles de blé prélevées dans le réseau en 2016 et en 2017. Chaque année, des feuilles présentant des symptômes de septoriose ont été collectées dans les parcelles d'essais de 2 sites à Ath et Thy-le-Château, espacés de 60 km (figure 11).



Figure 11 : Carte de la Belgique situant les deux champs expérimentaux de Ath et Thy-le-Château (<https://www.google.com/maps>).

Les caractéristiques phytotechniques des champs sont décrites dans le tableau 2. Dans chaque champ, l'essai est constitué de micro-parcelles de 2 mètres x 10-15

mètres disposées en bloc aléatoire complet. Chaque programme fongicide est appliqué sur 4 parcelles qui vont former les quatre répétitions.

Tableau 2: Données phytotechniques des champs expérimentaux (Ath et Thy-le-Château) et pour chaque année (2016 et 2017).

	Ath 2016	Ath 2017	Thy-le-Château 2016	Thy-le-Château 2017
Variété	Henrik	Henrik	Edgar	RGT reform
Précédent	Pomme-de-terre	Colza	Pomme-de-terre	Pomme-de-terre
Date de semis	14/10/15	21/10/16	13/10/15	13/10/16
Fumure	/	50-53-56 kgN/ha	/	/
Densité semis	350grains/m ²	350grains/m ²	270 grains/m ²	250 grains/m ²
Récolte	1/08/16	21/07/17	14/08/16	22/08/17
Date de collecte des feuilles	7/07/16	30/06/17	27/06/16	3/07/17

Une vingtaine de feuilles présentant des symptômes ont été prélevées dans chacune des répétitions des 4 programmes fongicides décrits dans le tableau 3. Ces feuilles ont été séchées à l'air libre et conservées au congélateur (-20°C) dans des enveloppes en papier jusqu'à l'étape d'isolement. La collecte des feuilles de blé avec les symptômes a été réalisée par Maxime Duvivier (CRA-W) 3 à 4 semaines après les derniers traitements correspondant plus ou moins à la réalisation d'un cycle complet de la septoriose à la fin du printemps. Les feuilles des étages supérieurs des plantes (F1 ou F2) ont été récoltées au centre de chaque parcelle afin de limiter la possibilité de contamination du blé avec des souches de parcelles voisines soumises à d'autres traitements fongicides.

Tableau 3: Description des traitements fongicides réalisés dans les parcelles expérimentales de Ath et Thy-le-Château où la collecte de feuilles septoriées a été effectuée en 2016 et 2017.

N°	Traitement	Dose par hectare		ST32 2 ^{ème} nœud	ST39 Dernière feuille	ST55 Épiaison
TE	Non traité	0				
T1	Adexar	1,5			x	
T2	Kestrel/Input* + Bravo Adexar	1,25 1,5	1	x		x
T3	Kestrel/Input* + Bravo Adexar	1,25 0,8	1	x		x
Adexar : Époxiconazole 62,5g/L + Fluxapyroxad 62,5g/L Kestrel : Prothioconazole 160 g/L + Tébuconazole 80g/L Input : Prothioconazole 160 g/L + Spiroxamine 300 g/L Bravo : Chlorothalonil 500g/L *le produit Input, utilisé en 2016, a été remplacé par le produit Kestrel en 2017.						

Les rendements des essais en kilos de blé par hectare (annexe II) ont été mesurés pour chaque programme fongicide. Des calculs de gains de rendement brut et net des programmes fongicides par rapport à leurs témoins ont été réalisés. Pour les calculs de gains de rendement brut, les valeurs du rendement des quatre parcelles témoins de l'essai sont soustraites aux quatre valeurs du rendement brut de chaque parcelle traitée afin d'obtenir la différence entre les témoins et chacune des modalités étudiées. Pour le gain de rendement net, le prix de vente du blé, les prix des produits ainsi que des coûts de passage des pulvérisations sont pris en considération. Un prix de 150€/T de blé est fixé pour les deux années 2016 et 2017. Les prix des produits ont été calculés par une moyenne des prix de différents fournisseurs et sont légèrement différents pour les deux années 2016 et 2017. Le coût de passage est fixé à 10€ avant le stade 39 et 15€ après ce stade.

Des cotations de sévérité pour plusieurs pathogènes fongiques sont également réalisées dans des parcelles témoins et des traitements pour les essais du réseau. Les résultats de ces cotations dans les parcelles témoins seront utilisés pour comparer la sévérité de la septoriose en fonction des années et des localités.

II.2. ISOLEMENTS MONO-CONIDIENS ET CONSERVATION

II.2.1 Isolement des souches 2017

Les isolements des souches dans les essais de la saison 2017 ont été réalisés durant l'année académique 2017-2018. L'objectif était d'obtenir une quarantaine de souches par programme fongicide et par champ soit approximativement 320 souches.

Pour réaliser un isolement, une lésion de septoriose est découpée et fixée sur une lame de verre de microscope (figure 12). La lame est placée dans des boîtes de Pétri contenant des filtres Whatman imbibés de 1 ml d'eau stérile afin de saturer en humidité l'air contenu dans la boîte. Les feuilles sont ensuite laissées 20 heures à température ambiante dans ce dispositif pour que les cirrhes soient expulsés des pycnides. L'âge de la lésion et l'âge de la feuille influencent généralement le temps nécessaire à la sortie des cirrhes. Plus vieille est la feuille, plus la période de sortie est longue. Au besoin, les feuilles sont incubées dans la boîte de Pétri quelques heures supplémentaires. Les cirrhes sont ensuite prélevés avec une fine aiguille de seringue et placés individuellement dans des tubes Eppendorf contenant 500 µl d'eau stérile et du Tween 20, un agent solubilisant. Le prélèvement d'un seul et unique cirrhe par feuille permet de garantir que toutes les conidies de ce cirrhe soient génétiquement identiques (McDonald et Martinez 1990). Le tube est vortexé pendant 30 secondes. Ensuite, un volume de 150 µl de la solution est étalé dans une boîte de Pétri sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar). La boîte est placée à l'étuve à 22°C durant 12 à 15 heures. Elle est ensuite observée sur microscope inversé afin de visualiser la germination des conidies. Pour réaliser le prélèvement mono-conidien, 2 cubes du milieu PDA contenant une seule conidie germée sont découpés dans la boîte de Pétri. Ces cubes sont placés à l'envers sur un nouveau milieu composé de PDA + chloramphénicol (antibiotique). La boîte est ensuite placée en chambre noire à 22°C pour une durée de 15 jours.

Après deux semaines, 1 ml d'eau-glycérol est ajouté à la surface d'une des deux colonies. La colonie est ensuite grattée doucement à l'aide d'une lame rodée afin de mettre les particules du champignon (mycélium et conidies) en suspension. La suspension est récupérée dans un tube à vis de 2 ml et conservée à -80°C. Un tube contenant un milieu PDA incliné est aussi inoculé en déposant 50 µl de la suspension sur la surface du milieu. Les tubes inclinés sont ensuite incubés pendant une semaine à l'obscurité à 22°C. Après une semaine, 10 ml de paraffine (préalablement autoclavée à deux reprises) sont ajoutés au tube afin de stopper la croissance et permettre la conservation des souches à température ambiante.

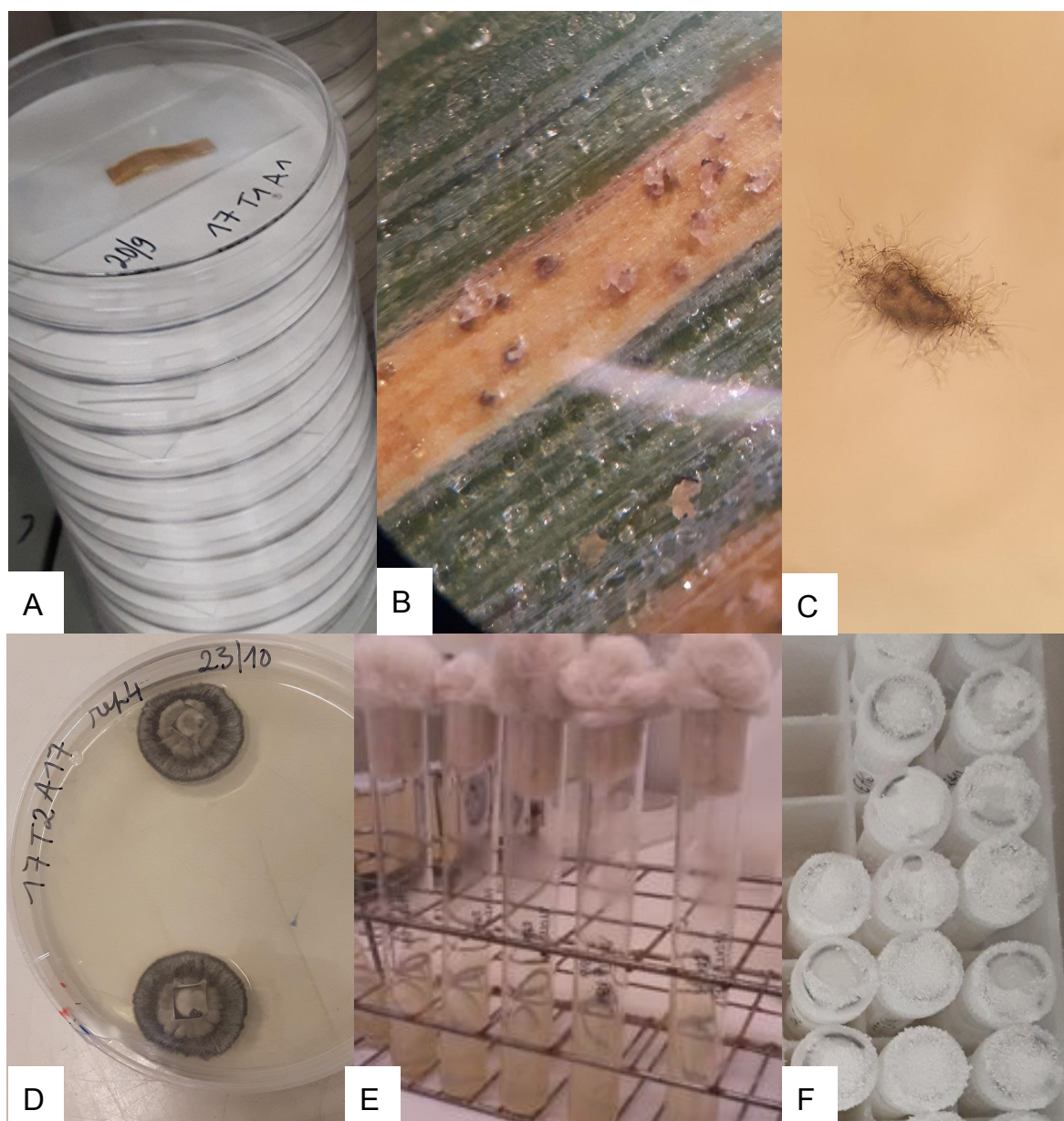


Figure 12: Illustration des principales étapes d'isolement mono-conidien de souches de *Z. tritici*. A : Feuille septoriée fixée sur une lame en boîte de Pétri. B : Sortie des cirrhes d'une lésion au grossissement 40x. C : Photo au microscope inversé (40x) d'une conidie germée après 80 heures. D : Deux colonies pures de *Z. tritici* sur PDA après 14 jours en chambre noire. E : Conservation des souches en tubes PDA inclinés. F : Conservation des souches en tubes à -80°C dans de l'eau-glycérol. Source : Photos personnelles.

II.2.2 Souches des collections 2008, 2009 et 2016.

Les souches des années 2008 et 2009 (listing en annexe III) sont issues d'un projet de recherche du laboratoire de phytopathologie de l'UCL, intitulé « Rôle du cycle sexuel de *Mycosphaerella graminicola* dans la sélection et la dispersion de la résistance aux fongicides » et financé par la RW (projet D31-1195). Les souches de 2008 ont été isolées à partir de feuilles récoltées en mars-avril avant tout traitement fongicide dans trois localités (Corroy-le-Grand, Sart-Risbart et Graux). Les souches de 2009 ont été isolées à partir de feuilles prélevées en juillet dans des parcelles non traitées de cinq localités wallonnes (Niverlée, Perwez, les Isnes, Graux et Thoremuais).

Les souches de 2016 ont, quant à elles, été isolées de la même façon que celle décrite dans ce travail par le laboratoire de phytopathologie et le CRA-W. Les souches 2016 utilisées pour le mémoire proviennent des mêmes sites d'essai que 2017 (Ath et Thy-Château) et ayant été soumis à des programmes fongicides similaires.

II.3. ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES SOUCHES

Un test sur plaques multi-puits (96 puits) a été réalisé afin d'évaluer les valeurs EC₅₀ qui sont, pour rappel, les doses en fongicide limitant par 50% la croissance mycélienne des souches. L'évaluation de l'EC₅₀ des souches mises en collection en 2008, 2009, 2016 et 2017 est réalisée pour deux fongicides SDHI, le fluopyram et le fluxapyroxad (figure 13). Ces molécules font partie de groupes chimiques distincts. La matière active fluopyram fait partie des Pyridinyl-ethyl-benzamides et la matière active fluxapyroxad fait partie des Pyrazole-carboxamides. Les deux molécules fongicides ont été commandées sous forme de concentrés :

- Fluopyram PESTANAL® n°32462-50 mg (Sigma-Aldrich, Allemagne)
- Fluxapyroxad C-3875000 de la marque Dr. Ehrenstorfer GmbH (LGC, Allemagne)

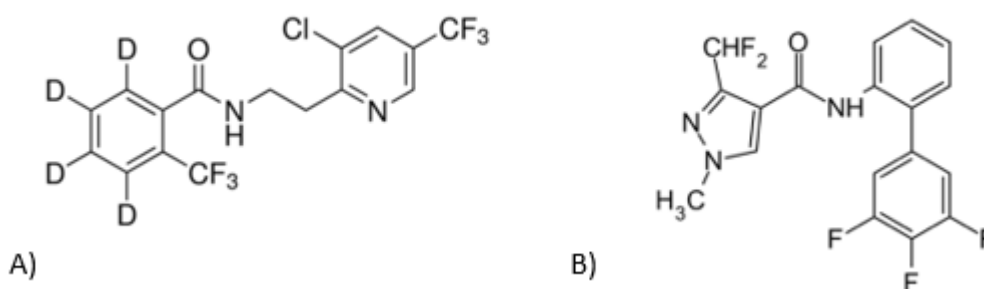


Figure 13 : Structures moléculaires des molécules fongicides : A) le fluxapyroxad et B) le fluopyram. Source : Sigma-Aldrich.

Pour déterminer la valeur EC₅₀ d'une souche pour un fongicide, un inoculum est d'abord préparé. Un volume de 30 µl de suspension d'eau-glycérol d'une souche provenant du tube conservé à -80°C, est déposé sur une mini-boîte de Pétri contenant du milieu Yeast Malt Agar (YMA). La solution est répartie sur la surface du milieu avec un fil de platine stérile. Les boîtes sont ensuite incubées à l'obscurité à 22°C durant 7 jours. Ensuite, 5 ml de solution de Potato Dextrose Broth (PDB) sont ajoutés dans la boîte. A l'aide d'une lame rodée, la surface du milieu est grattée pour mettre en suspension les particules fongiques. La suspension obtenue est filtrée à l'aide d'un filtre EasyStrain-100 µm¹⁸ afin de ne laisser passer que les conidies du champignon mais retenir les morceaux de gélose du milieu ainsi que le mycélium. La concentration en particules fongiques (conidies) est approximée au moyen d'une cellule THOMA. Elle est ajustée à l'aide de solution PDB pour obtenir une

¹⁸ Les filtres proviennent de GREINER BIO-ONE (UK) : ce sont des EASYstrainer™ 100 µm adaptés pour des tubes 50 ml, stérilement emballés par pièce unique.

concentration de 100 000 conidies/ml. Les plaques multi-puits sont remplies avec huit concentrations de fongicides qui ont préalablement été préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pur et conservées au frigo avant utilisation. La plaque 96 puits est organisée en disposant les concentrations de fongicides selon les colonnes et ensuite les différentes souches de septoriose selon les lignes (figure 14). Les concentrations vont de 0 à 30 mg/L de matière active. Chaque puits est rempli avec 150 µl de solution fongicide dans lequel sont ajoutés 50 µl de PDB seul (première ligne) ou 50 µl de PBD avec des conidies de la souche en suspension (ligne 2 à 12). Par plaque, 10 souches peuvent être testées. En pratique, la première ligne est remplie avec uniquement du PDB (utilisé comme témoin), la seconde ligne avec une souche de septoriose de référence (reprise dans toutes les plaques comme contrôle interne inter-plaque) et les 10 autres lignes avec 10 souches à tester. Les plaques remplies sont incubées durant 7 jours précisément à 22°C à l'obscurité. Ensuite, l'absorbance de chaque puits est mesurée avec un spectrophotomètre, Multiskan™ FC Microplate Photometer (ThermoFischer, USA) à une longueur d'onde de 405 nm.

	H	G	F	E	D	C	B	A	
	Concentrations fongicides →								
Blancs	0	0,04	0,123	0,37	1,1	3,3	10	30	1
Référence	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	2
Souche 1	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	3
Souche 2	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	4
Souche 3	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	5
Souche 4	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	6
Souche 5	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	7
Souche 6	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	8
Souche 7	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	9
Souche 8	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	10
Souche 9	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	11
Souche 10	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+	12

Figure 14 : Organisation d'une plaque de 96 puits utilisée dans le test-fongicide permettant la détermination des valeurs EC50 des souches pour un produit fongicide. Les lignes représentent les différentes souches de *Zymoseptoria tritici* et les colonnes représentent les différentes concentrations fongicides. La première ligne n'est pas inoculée (Blanco avec 50 µl de PDB et 150 µl de solution fongicide). Il n'y a pas de fongicide dans la première colonne (=croissance témoin de la souche sans fongicide). La deuxième ligne est remplie avec l'inoculum d'une souche de référence placée dans toutes les plaques. Les dix souches à tester sont inoculées dans les lignes 3 à 12. Les « + » mentionnent les cases qui contiennent une souche d'agent pathogène à tester.

Deux plaques identiques sont produites pour les mêmes souches (répétition technique) et chaque plaque est lue au spectrophotomètre deux fois (répétition mécanique) en mélangeant préalablement les puits (fonction « shake before measurement » sur le Multiskan). Pour chaque fongicide, 4 fichiers sous format TXT sont obtenus provenant des 4 lectures (2 lectures de la plaque n°1, 2 lectures de la plaque n°2).

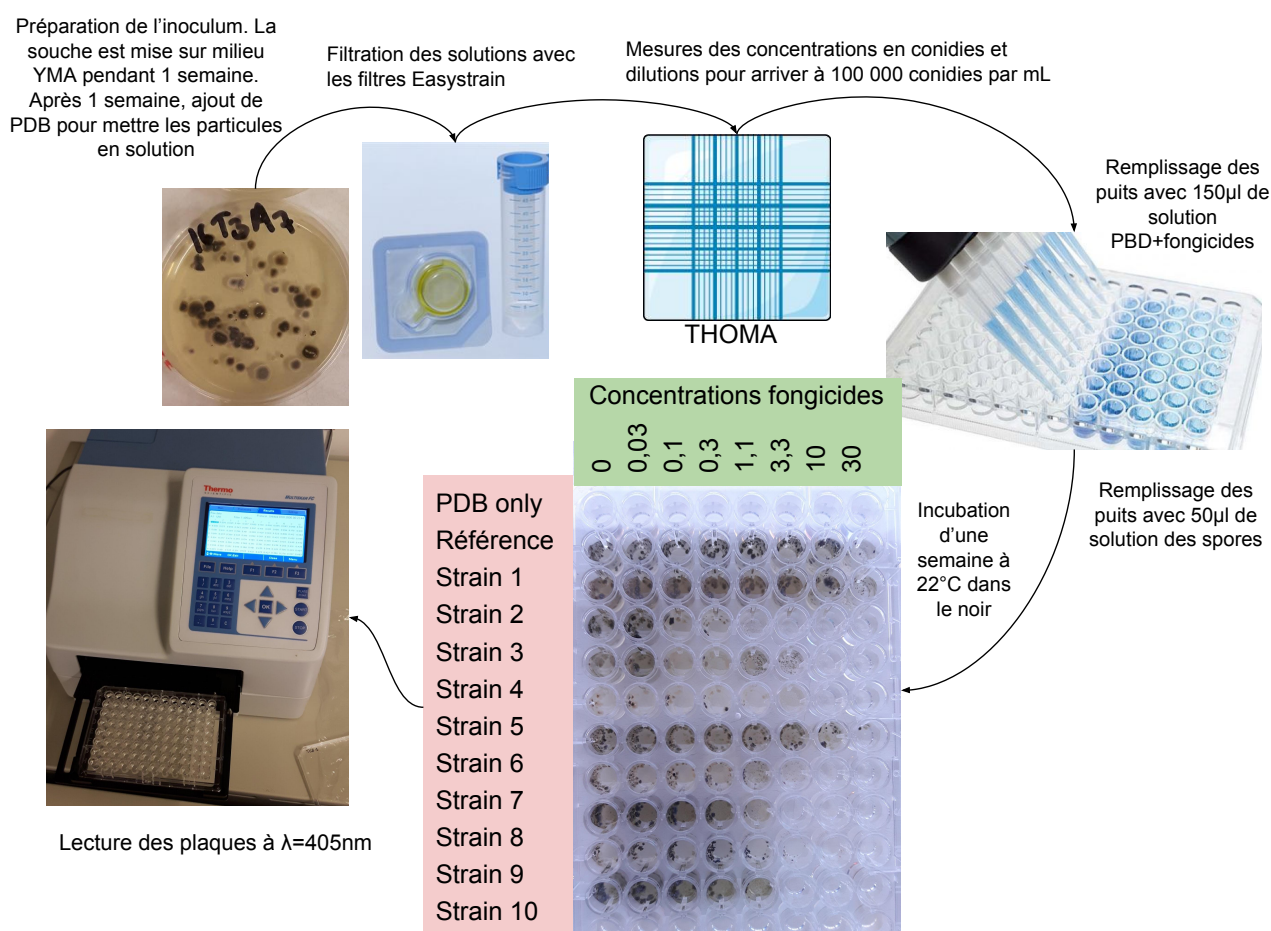


Figure 15 : Méthodologie du test fongicide in vitro utilisé pour évaluer la sensibilité des souches de *Zymoseptoria tritici* en plaques multi-puits.

Les données ont ensuite été traitées par un script dans le programme R¹⁹. Le programme permet de réaliser une régression logistique et de trouver la valeur de l'EC50 des souches pour chaque fongicide. Les valeurs d'absorbance des blancs sont d'abord soustraites à chaque valeur de la plaque pour enlever l'influence du milieu PDB et du DMSO. Ensuite, des moyennes des deux lectures d'une plaque sont réalisées pour obtenir une valeur moyenne par plaque. Chaque valeur est divisée par

¹⁹ R est un logiciel gratuit pour le calcul statistique et graphique <https://www.r-project.org/>

celle des témoins de la première colonne pour obtenir le facteur de croissance par rapport au témoin. Le programme réalise la régression logistique pour trouver l'EC50. Deux valeurs d'EC50 pour chaque souche sont obtenues (1 valeur de la plaque 1 et une seconde valeur de la plaque 2). Une étape de normalisation avec la souche de référence (nommée C3) mise dans la deuxième ligne de chaque plaque permet de diminuer le biais créé entre les journées d'expériences. Toutes les valeurs d'EC50 de la souche de référence sont moyennées pour toutes les dates d'expérience (C3moy). Chaque valeur de C3 des différentes plaques est divisée par le C3moy afin d'obtenir un facteur de correction. Enfin, chaque valeur d'EC50 des souches est divisée par le facteur de correction correspondant. Après normalisation, une moyenne des deux valeurs obtenues par souche est effectuée par n'avoir qu'une valeur unique d'EC50 par souche.

Une journée de travail en laboratoire permet de réaliser l'évaluation de l'EC50 de 20 souches pour 4 fongicides ce qui représente 16 multi-plaques. La sensibilité de 338 souches a été évaluée au total (39 souches en 2008, 24 souches en 2009, 113 souches en 2016 et 162 souches pour 2017). Ce schéma a été répété pour les quatre fongicides choisis (deux molécules SDHI : fluopyram et fluxapyroxad et deux molécules triazoles : tébuconazole et prothioconazole, en collaboration avec Lucas Yzerbyt, étudiant Master 2 en 2018).

Une stimulation de la croissance du champignon à des faibles concentrations de fongicide est parfois observée. Cela entraîne une valeur d'EC50 légèrement inférieure par rapport à une situation où la croissance diminue continuellement au départ du témoin. Quand l'inhibition est totale (dans les concentrations de fongicides élevées par exemple), l'absorbance du milieu est très proche de celle du blanco. Lorsque la souche a poussé dans le puits témoin mais que la croissance dans la plus faible concentration en fongicide testée (0,03 mg/L) se situe déjà en dessous de l'EC50, le script en R note NA car il n'arrive pas à trouver l'EC50. Les valeurs EC50 de ces souches ont dès lors été fixées à 0,02 mg/L qui correspond à la moitié de la première concentration en fongicide. Les valeurs supérieures à 30 mg/L calculées par R, ont été fixées à 30 mg/L. Les quelques souches dont les puits ont été contaminés par des bactéries et ayant des valeurs d'absorbance supérieures à 1 ont été retirées des résultats. Si une souche n'a pas poussé dans le milieu sans fongicide (témoin) alors elle a également été retirée des résultats et l'évaluation de son EC50 n'a malheureusement pas pu être répétée.

II.4. SÉQUENÇAGES DU GÈNE CIBLE

Sur base des résultats des EC50 des souches face aux 4 molécules fongicides, le fluxapyroxad et le fluopyram ainsi que le tébuconazole et prothioconazole (analysés dans le cadre du mémoire par Lucas Yzerbyt), les souches ont été classées en quatre catégories distinctes afin de choisir les souches envoyées au séquençage :

1. Souches résistantes aux fluxapyroxad (et fluopyram)
2. Souches résistantes aux fluxapyroxad et prothioconazole (et fluopyram)
3. Souches résistantes aux prothioconazole (et tébuconazole)
4. Souches sensibles (EC50 faibles pour tous les fongicides)

Une sélection totale de 30 souches pour les quatre classes a été établie pour le séquençage. Tout d'abord, leur ADN a été extrait. Pour cela, les cultures des souches obtenues dans le PDB sans fongicide (témoin) des plaques multi-puits ont été utilisées. Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN ont été employées afin d'arriver aux résultats espérés : soit une extraction rapide avec le kit « Smartextract DNA kit » de Eurogentec (Belgique) ou la méthode plus classique d'extraction CTAB chloroforme-éthanol. Pour les deux méthodes, une solution de 50 µl de PDB et de particules fongiques a été prélevée dans les puits des plaques en prenant soin de collecter le maximum de matériel fongique (morceaux de mycélium).

Pour le kit, la solution a été mise dans des tubes à microbilles et passée au FAST-Prep pendant 45 sec à la vitesse 6 avec le réactif d'extraction A du kit. Ensuite, un temps de centrifugation de 2 min (11 000 rpm) suivi de 10 min d'incubation à 98°C est nécessaire. Un second réactif B est ajouté suivi d'une centrifugation de 2 min. Enfin, 50 µl du surnageant seront prélevés en évitant de prendre des particules du culot.

Les étapes d'extraction sont plus nombreuses pour la méthode CTAB. Le début de l'extraction est identique à la méthode du kit avec les 50 µl de solution de PDB et de matériel fongique déposés dans un tube à microbilles contenant 500 µl du tampon Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) et passé au FAST-Prep durant 40 sec à la vitesse 6. Deux temps d'incubation suivent cette étape avec une première période de 10 min à 42°C suivie d'une deuxième période de 10 min à 60°C. 500 µl de chloroforme : isoamylalcohol (24 :1) sont ajoutés et sont vortexés pour bien émulsifier la solution. Une période de 10 min d'incubation sur glace et une centrifugation de 10 min (13 000 rpm) s'en suit. 500 µl du surnageant sont récupérés et placés dans un nouveau tube. 194 µl de polyethylene glycol (PEG) à 30% et 100 µl de NaCl (5M) sont ajoutés au nouveau tube. Le tube est mélangé et centrifugé 15

min (13 000 rpm). Le surnageant est éliminé et 100 µl d'éthanol glacial à 70% sont ajoutés pour rincer le culot. Une centrifugation de 10 min (13 000 rpm) est suivie de 30 min de SPEED-Vac qui permet d'enlever l'éthanol restant. Enfin, le culot est dissous dans 25 µl d'eau biomoléculaire.

Une lecture au NANODROP est ensuite réalisée afin de déterminer la pureté des extraits d'ADN obtenus et en déterminer la concentration. Une dilution dans de l'eau biomoléculaire est ensuite effectuée afin d'obtenir une concentration d'ADN de +/- 10 mg/µl avant la PCR.

Le gène SDH a ensuite été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction). Un MIX PCR est préparé (tableau 4) avec une polymérase Q5 High fidelity Polymerase (Bio-Labs, New England) pour l'amplification du gène SDH-C (sous-unité C du gène SDH). Un volume de 22,5 µl de ce MIX est réparti dans chaque tube PCR en y ajoutant 2,5 µl de l'échantillon d'ADN. Les amorces utilisées pour cibler le gène SDH-C sont les séquences suivantes dessinées par Pierre Hellin (firme Eurogentec, Belgique):

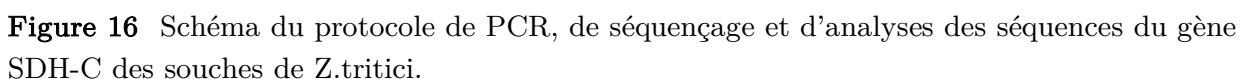
- SdhC-Forward: CACCACCCCTCCACTCTC
- SdhC-Reverse: ACTCCCTTGGGTCCTGATG

Les tubes PCR sont placés dans le thermocycleur en programmant le cycle PCR suivant : une dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 30 secondes (amplicon de 1kb), puis 40 cycles incluant une dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 sec, une hybridation des amorces à 68°C pendant 30 sec puis une étape d'élongation à 72°C de 1 minute, et une élongation finale de l'ADN à 72°C pendant 2 minutes.

Tableau 4 : Composition du mélange pour la réalisation de la PCR pour l'amplification du gène SDH-C.

MIX	Volume final (µl)	
	25	50
Water	14,25	28,5
Buffer	5	10
dNTP	0,5	1
Amorce Forward (10 µM)	1,25	2,5
Amorce Reverse (10 µM)	1,25	2,5
Q5 polymérase (2000 unités/ml)	0,25	0,5
DNA (25-50 ng/µl)	2,5	5

Pour le séquençage, un seul échantillon par souche est préparé pour le gène SDH-C avec son amorce forward. Une partie des séquençages (25 souches) a été traitée par l'entreprise MACROGEN aux Pays-Bas qui utilise la méthode de Sanger (<https://dna.macrogen.com/eng/index.jsp>) avec les Didéoxynucléotides (ddNTP) pour le séquençage d'ADN. Une autre partie (5 souches) a été envoyée au siège belge de EUROFINIS (<https://www.eurofins.com/>) qui utilise la même technique de séquençage. Les séquences ont ensuite été assemblées et alignées avec les logiciels Sequencher, BLAST et Ugene et les substitutions d'acides aminés ont été notées.



II.5. ANALYSE DES TRAITS D'AGRESSIVITÉ

Des traits d'agressivité ont été mesurés en étudiant, en conditions contrôlées et après inoculation d'une quantité connues de conidies, l'évolution des symptômes de 25 souches de *Z. tritici*. L'expérience a été réalisée sur quatre variétés de blé. Les souches testées sont d'une part, 23 souches parmi les 30 souches précédemment séquencées et, d'autre part, une souche connue comme résistante aux triazoles venant de France (avec la mutation S524T dans le gène CYP51) ainsi qu'une souche connue comme résistante aux SDHI venant d'Irlande (avec la mutation C-H152R dans le gène SDH).

Un bio essai a été mis en place dans la serre L2Q de la plateforme SEFY à l'UCL. La sensibilité des variétés avait été évaluée par une échelle d'un niveau très sensible (--) jusqu'à une tolérance élevée (++) par les équipes de recherche qui réalisent chaque année le Livre Blanc des Céréales (édition 2018). Quatre variétés de sensibilité différente et actuellement cultivées en région wallonne ont été choisies. La première est l'Olympus qui a une tolérance élevée à la septoriose (++), la deuxième est la Chevignon avec une tolérance à la septoriose (+), la troisième variété est la RGT reform avec une sensibilité moyenne (=), et enfin, la quatrième est la variété Henrik qui a une sensibilité pour la septoriose (-). **La première étape** du test consiste à préparer les échantillons végétaux et fongiques. Pour cela, les graines ont été plantées, directement en pots, trois semaines et demi avant la date d'inoculation afin que les plantules aient le temps d'atteindre une taille adéquate. Pour faciliter les observations, les quatre variétés ont été numérotées de A à D (A = Olympus, B= RGT reform, C= Chevignon et D=Henrik) durant la période d'essai. Les températures durant la germination, levée des plantes et croissance des semis sont de 10-15°C (nuit/jour) avec une humidité relative de 80% en moyenne. Pour réaliser l'inoculation, les inoculums ont été préparés dans des mini-boîtes de Pétri contenant des milieux YMA une semaine avant la date d'inoculation. **La deuxième étape** est l'inoculation des plantules. Une solution d'eau et de Tween20 est ajouté dans les boîtes de Pétri contenant les souches de *Z. tritici*. La surface du milieu est légèrement grattée à l'aide d'une lame rodée pour mettre en suspension les particules fongiques (conidies et morceaux de mycélium). Les suspensions fongiques sont ensuite filtrées par des EasyStrain-100 µm et leur concentration en conidies est mesurée à l'aide d'une cellule de THOMA. Les solutions sont portées à une concentration de 150 000 conidies/ml. Ensuite, une zone de 5 centimètres est délimitée par deux traits aux marqueurs fins indélébiles sur la plus jeune feuille de chaque plantule. Chaque zone de 5 centimètres, préalablement marquée, est inoculée à l'aide de pinceaux de peinture autoclavés (de taille 4 ou 8). Une seule feuille sur chaque plantule du pot est donc inoculée. Les pots comprennent 3 plantules. L'opération est répétée dans trois pots pour obtenir 9 feuilles inoculées au total par souche. En plus des 25 souches,

deux témoins sont installés : un témoin nommé « tween » qui est uniquement inoculé avec une solution d'eau et de Tween20 dans la zone délimitée par les marqueurs ; de même qu'un témoin « marqueur » avec uniquement les deux traces des marqueurs. Au total, il y a donc 27 modalités (25 souches de *Z. tritici* et les 2 témoins) x 3 pots x 3 feuilles x 4 variétés = 972 feuilles à observer. Chaque pot est disposé sur une des 3 tables en veillant à ce que deux mêmes souches sur des variétés différentes ne soient pas côte à côte. Trois tables d'expérimentations sont ainsi obtenues avec chacune les 27 modalités sur quatre variétés. **La troisième étape** est l'infection par le pathogène. Pour garantir celle-ci, l'humidité doit être élevée durant les heures qui suivent l'inoculation. La confection de « mini-serres » a été réalisée à l'aide d'une bâche de plastique transparente et des tuteurs sur les trois tables. Elles permettent de conserver une humidité relative élevée durant les 80 heures après l'inoculation (figure 17). L'arrosage des plantes se fait par le bas en remplissant les tables d'un fond d'eau afin d'éviter le contact avec les zones inocuées. Une solution d'Hoegland a été ajoutée deux semaines après le semis lors d'un arrosage afin de renforcer la nutrition des plantes.

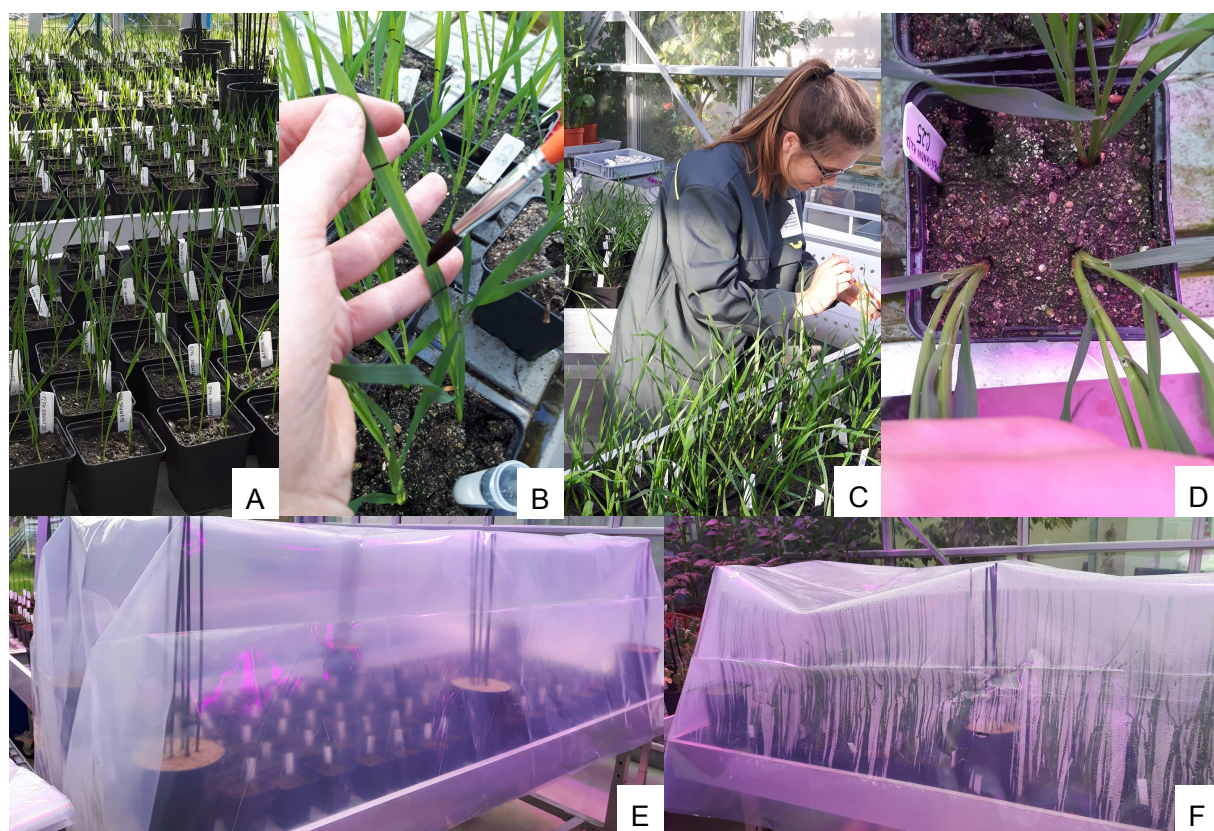


Figure 17 : Étapes de l'inoculation en serres pour le test « traits de fitness ». **A :** Croissance des plantules. **B :** Inoculation à l'aide d'un pinceau sur une zone de 5 cm marquée aux marqueurs par deux traits. **C :** Journée d'inoculation en serres. **D :** Trois plantules dans chaque pot, disposés de la même manière afin de faciliter les observations. **E :** Test des « mini-serres ». **F :** Saturation de l'humidité dans les « mini-serres » après 80h d'installation. Source: Photos personnelles.

Les symptômes ont été évalués selon une échelle de cotation (figure 18). Cette échelle permettait la détermination de la période d'incubation, temps entre l'inoculation et les premiers **symptômes visibles**, et la période de latence, intervalle de temps entre l'inoculation et l'apparition des premières **fructifications** (nommés également pycnides).

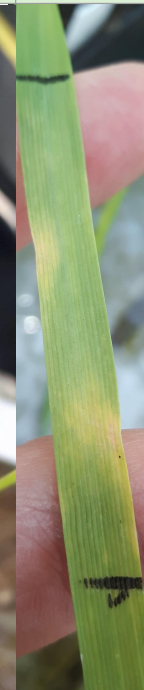
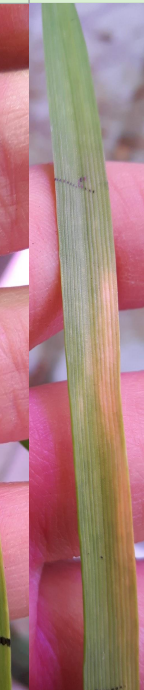
0	1	2	3	4	5	6	/
Pas de symptômes	Jaunissement ou phénomène physiologique	5-10% de la zone est en chlorose/ nécrosée par <i>Z.tritici</i>	10-20% de la zone est en chlorose/ nécrosée par <i>Z.tritici</i>	20-40% de la zone est en chlorose/ nécrosée par <i>Z.tritici</i>	40-60% de la zone est en chlorose/ nécrosée par <i>Z.tritici</i>	60-90% de la zone est en chlorose/ nécrosée par <i>Z.tritici</i>	Dégât sur la zone (feuille qui a trempée dans l'eau ou autre)
							

Figure 18 : Clef de cotation des symptômes sur feuille de blé inoculée par des souches de *Z. tritici* sur une zone de 5 centimètres. Source: Photos personnelles.

II.6. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNÉES

Toutes les analyses statistiques des données ont été réalisées avec le logiciel R²⁰. Pour cela, des tests d'ANOVA ont été utilisés pour chaque comparaison. En plus de l'ANOVA, des comparaisons multiples ont été analysées avec le test Student-Newman-Keuls (SNK) et le test de Tukey.

- Pour les tests concernant les gains de rendement

Les tests comparent les moyennes des gains de rendement des programmes fongicides (T1, T2 et T3) au sein d'un même champ d'essai et d'une seule année (ex: Ath en 2016) :

- ❖ Comparaisons entre les gains de rendement **brut**.
- ❖ Comparaisons entre les gains de rendement **net**.

- Pour les tests concernant la sensibilité des souches

Pour chaque fongicide (fluopyram et fluxapyroxad), les tests comparent la sensibilité de :

- ❖ La population de souches de 2008-2009 comparée à celle actuelle de 2016-2017.
- ❖ La population (2016 et 2017 ensemble) de Ath comparée à celle de Thy-le-Château.
- ❖ La population (Ath et Thy-le-Château ensemble) de 2016 comparée à 2017.
- ❖ Les populations de chaque programme fongicide (TE, T1, T2 et T3) de manière générale (toutes les souches de 2016 et 2017 et des deux champs)
- ❖ Les populations de chaque programme fongicide (TE, T1, T2 et T3) de façon séparée en comparant les populations des sous-groupes : uniquement les souches de Ath, uniquement de Thy-le-Château, uniquement de 2016 ou uniquement de 2017.
- ❖ Les populations des souches isolées de parcelles non-traitées de 2008-2009, de 2016 et 2017.

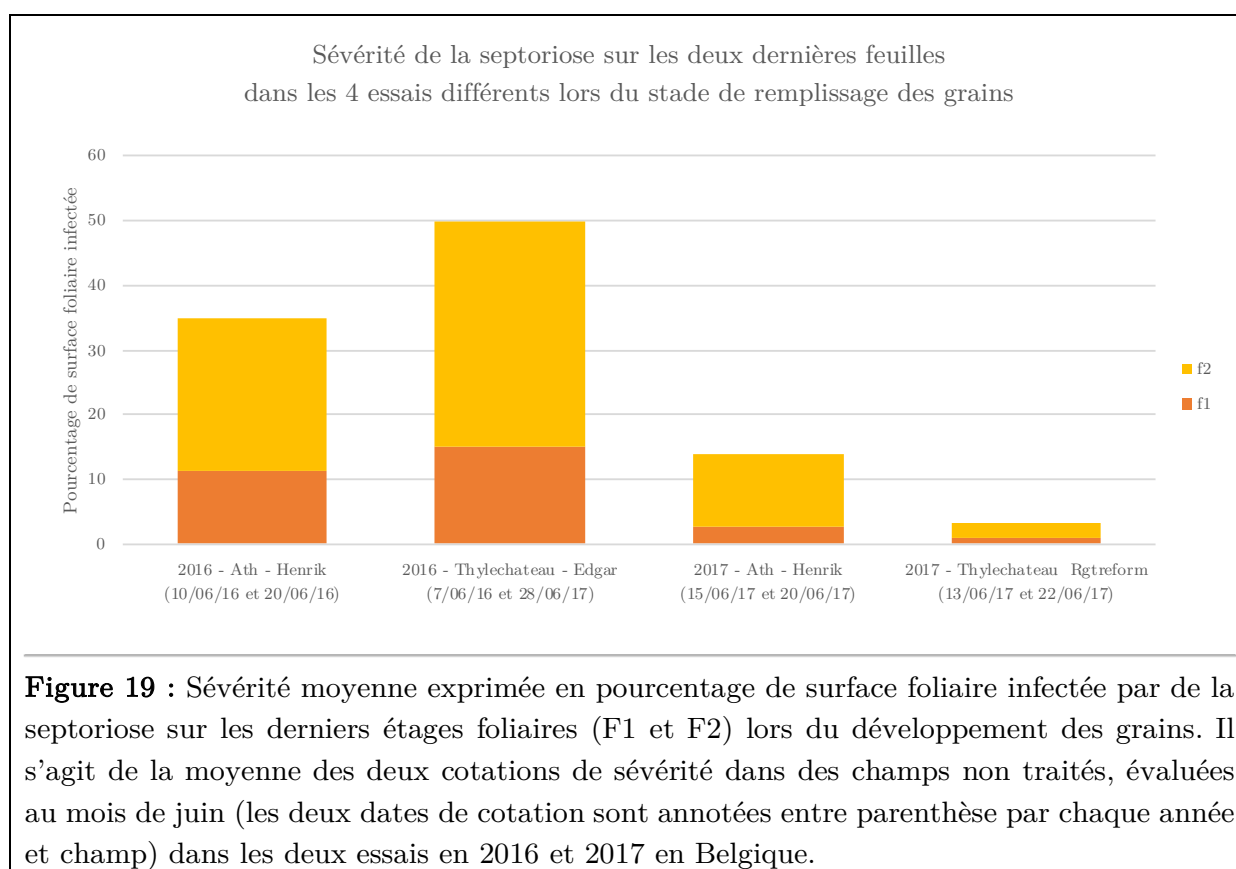
Une corrélation entre les deux molécules fongicides a également été déterminée avec le coefficient de corrélation Pearson.

²⁰ Crawley MJ, Statistics: An Introduction Using R. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK (2005).

III. RÉSULTATS

III.1. SÉVÉRITÉ ET RENDEMENTS EN CHAMPS

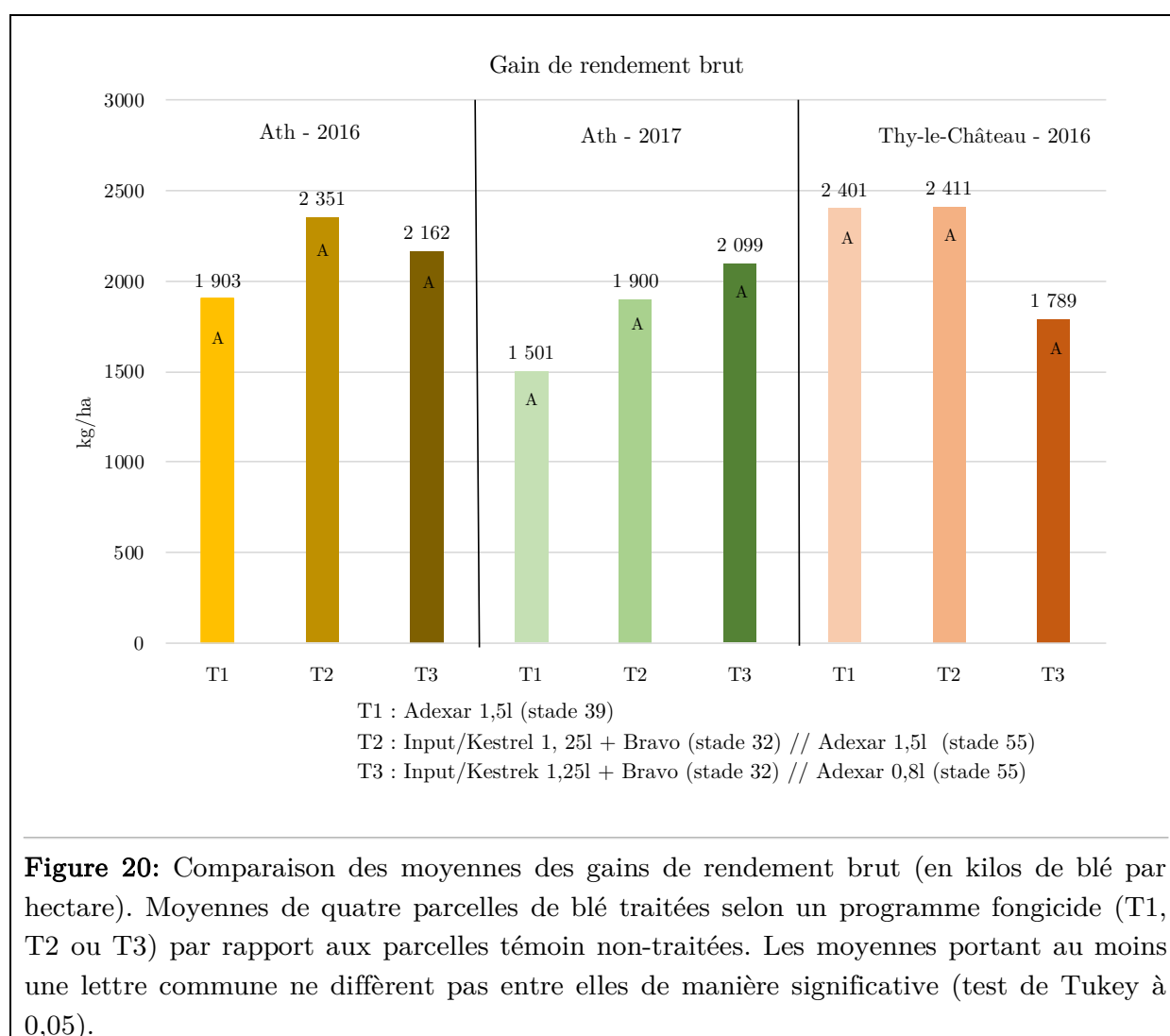
Les résultats du « Réseau d'essais fongicides wallons » permettent de comparer la sévérité de la septoriose sur les derniers étages foliaires (feuilles F1 et F2) des quatre essais (figure 19). La sévérité de la septoriose, évaluée sur des parcelles témoins, a été en moyenne plus élevée dans les essais de 2016 que dans ceux de 2017. En 2017, la pression en septoriose a été plus importante à Ath qu'à Thy-le-Château.



Les résultats du « Réseau d'essais fongicides wallons » permettent aussi de comparer les rendements obtenus dans les programmes fongicides. Il faut noter que les données de rendements de l'essai de Thy-le-Château en 2017 ne sont pas exploitables car trop hétérogènes. La sécheresse dans ce champ a entraîné le déclassement de plusieurs parcelles ainsi qu'un biais sur l'effet des traitements.

Le rendement moyen des parcelles **témoins** (non traitées) est d'environ 6 tonnes en 2016 à Ath et Thy-le-Château et 9 tonnes en 2017 à Ath comparé à celui des parcelles **traitées** d'environ 8 tonnes en 2016 et 10,5 tonnes en 2017.

Une comparaison a été réalisée entre les gains de rendement brut des différents programmes fongicides dans les trois essais observés (figure 20). L'observation graphique montre qu'à Ath, les programmes à deux traitements sont plus efficaces que le programme à un seul traitement. À Thy-le-Château en 2016, les rendements du programme T1 (comportant un seul passage avec Adexar 1,5 L (stade 39)) et T2 (comportant deux passages avec un premier passage avec Input 1,25 L + Bravo 1l (stade 32) et un deuxième avec Adexar 1,5 L (stade 55)) sont presque identiques. Toutefois, aucun des tests statistiques de Tukey au sein de chaque champ ne confirment de différence significative entre les programmes.



La prise en compte du prix de vente du blé, des coûts des produits et des passages des pulvérisations permettent d'obtenir les gains de rendement net (figure 21). Ceux-ci reflètent mieux les résultats économiques des programmes.

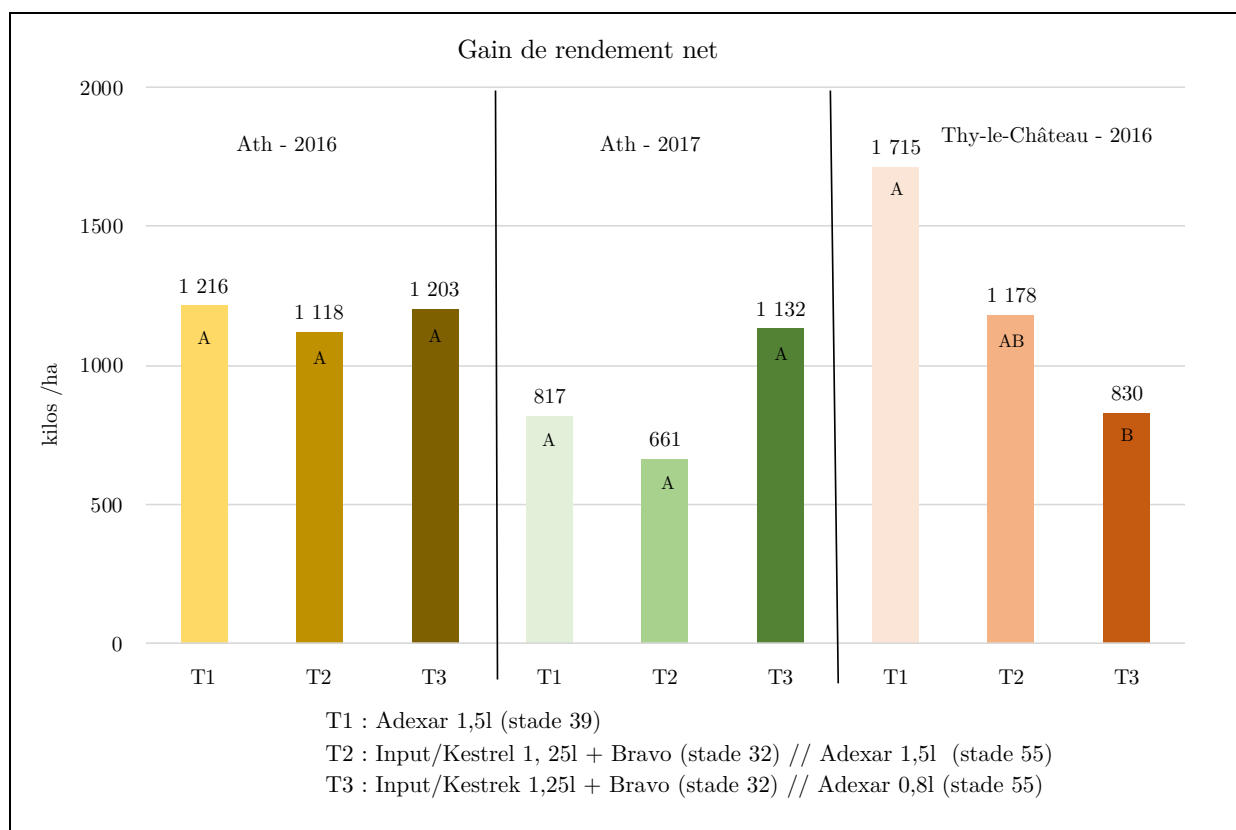


Figure 21: Comparaison des moyennes de gains de rendement net (par kilos de blé par hectare). Moyennes de quatre parcelles de blé traitées selon un programme fongicide (T1, T2 ou T3) par rapport aux parcelles témoin non-traitées en prenant en compte le prix de vente et les coûts de protection fongicide. Les moyennes portant au moins une lettre commune ne diffèrent pas entre elles de manière significative (test de Tukey à 0,05).

Les résultats ne vont pas dans le même sens que ceux observés en gain de rendement brut. A Ath, les gains entre les programmes fongicides ne sont pas significativement différents. Graphiquement, en 2017, c'est le programme T3 avec les deux passages et une demi-dose pour le produit SDHI qui admet le meilleur gain moyen mais les tests statistiques ne confirment pas de différence significative avec les autres programmes. En 2016 à Thy-le-Château, le programme T1 qui comprend un seul passage de protection fongicide est significativement différent du T3 mais pas du T2.

III.2. RÉSULTATS DES ISOLEMENTS

A partir de l'ensemble des feuilles collectées dans les différentes parcelles d'essais en 2016 et 2017, un total de 328 souches (listing en annexe II) ont été isolées et purifiées **pour l'année 2017**. Un total de 201 souches ont été isolées pour le champ de Thy-le-Château (travail réalisé par Lucas Yzerbyt, étudiant Master 2 en 2018) et 127 souches pour celui de Ath (travail réalisé par Alice Nysten). La différence entre le nombre de souches isolées par champ s'explique par la contamination dans une étuve de 45 souches de *Z. tritici* en cours d'isolement, par la fusariose ainsi que la quantité moindre d'échantillons de feuilles récoltées pour le site de Ath.

Les souches conservées à -80°C et repiquées sur milieu YMA poussent plus rapidement et de manière plus homogène que celles des tubes inclinés remplis de paraffine. Les souches de 2016 dont la sensibilité a été analysée dans le cadre de ce mémoire étaient uniquement conservées en collection dans des tubes PDA inclinés et nous les avons donc mis en conservation en tubes de 2 ml et placées à -80°C pour augmenter leur longévité et la facilité de manipulation.

III.3. CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES

La sensibilité des souches à deux molécules SDHI testées, le fluopyram et le fluxapyroxad, a été évaluée par un test sur plaque multi-puits visant à déterminer leurs valeurs d'EC50. Pour rappel, une souche est sensible à une molécule fongicide si sa valeur d'EC50 est faible et qu'il faut une concentration faible en fongicide pour stopper sa croissance de 50%. A l'inverse, une souche est résistante si sa valeur d'EC50 est élevée. Au total, la sensibilité de 320 souches monoconidiennes, provenant des différents champs et différentes années, a été évaluée. Toutefois, en raison de contaminations bactériennes dans certaines souches en croissance dans les plaques multi-puits ou de la faible croissance de certaines, les résultats ne sont valables que pour 305 souches : 39 souches pour 2008, 24 pour 2009, 113 pour 2016 et 129 pour 2017. Pour les souches isolées en 2016 et 2017, des gammes de valeurs d'EC50 ont été formées avec les valeurs extrêmes des EC50. Pour chacune des matières actives, une moyenne, une médiane ainsi que l'écart standard ont été calculés par calculs statistiques à l'aide d'Excel (tableau 5). Une forte différence est relevable entre les deux substances actives. La valeur moyenne des EC50 est plus élevée pour la substance du fluopyram que pour le fluxapyroxad et indique que ce dernier est plus actif à une concentration moindre que le fluopyram.

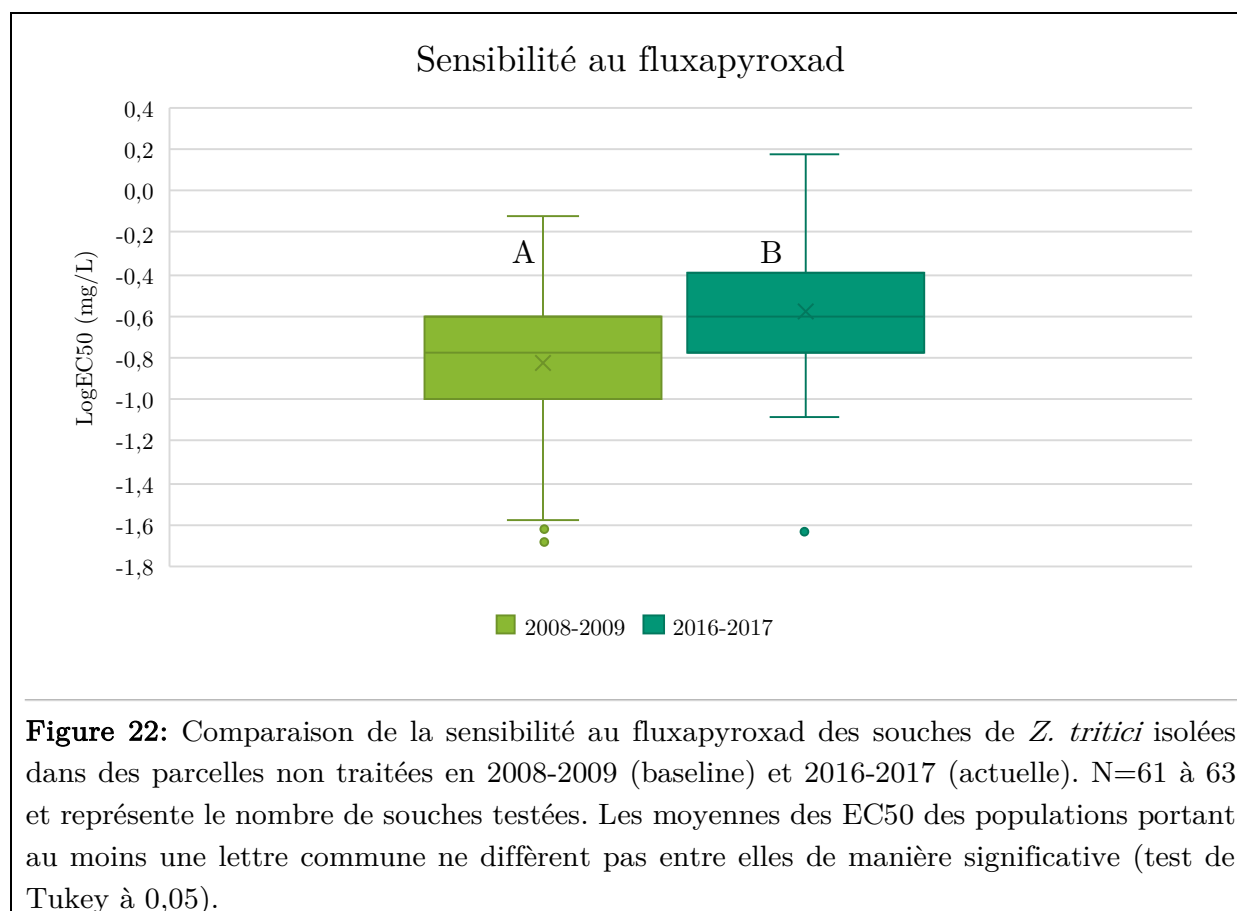
Tableau 5: Résumé de la sensibilité aux fongicides (EC50 en mg/L) des 242 souches belges de *Z. tritici* (isolées en champs sur deux sites expérimentaux (Ath et Thy-le-Château) en 2016 et 2017) par matière active (fluopyram et fluxapyroxad).

Matière active	Gamme de valeurs	Moyenne	Médiane	Ecart SD
Fluxapyroxad	0,02 - 6,45	0,54	0,29	0,67
Fluopyram	0,092 -30	3,94	1,45	5,98

III.3.1 Sensibilité des souches au fluxapyroxad

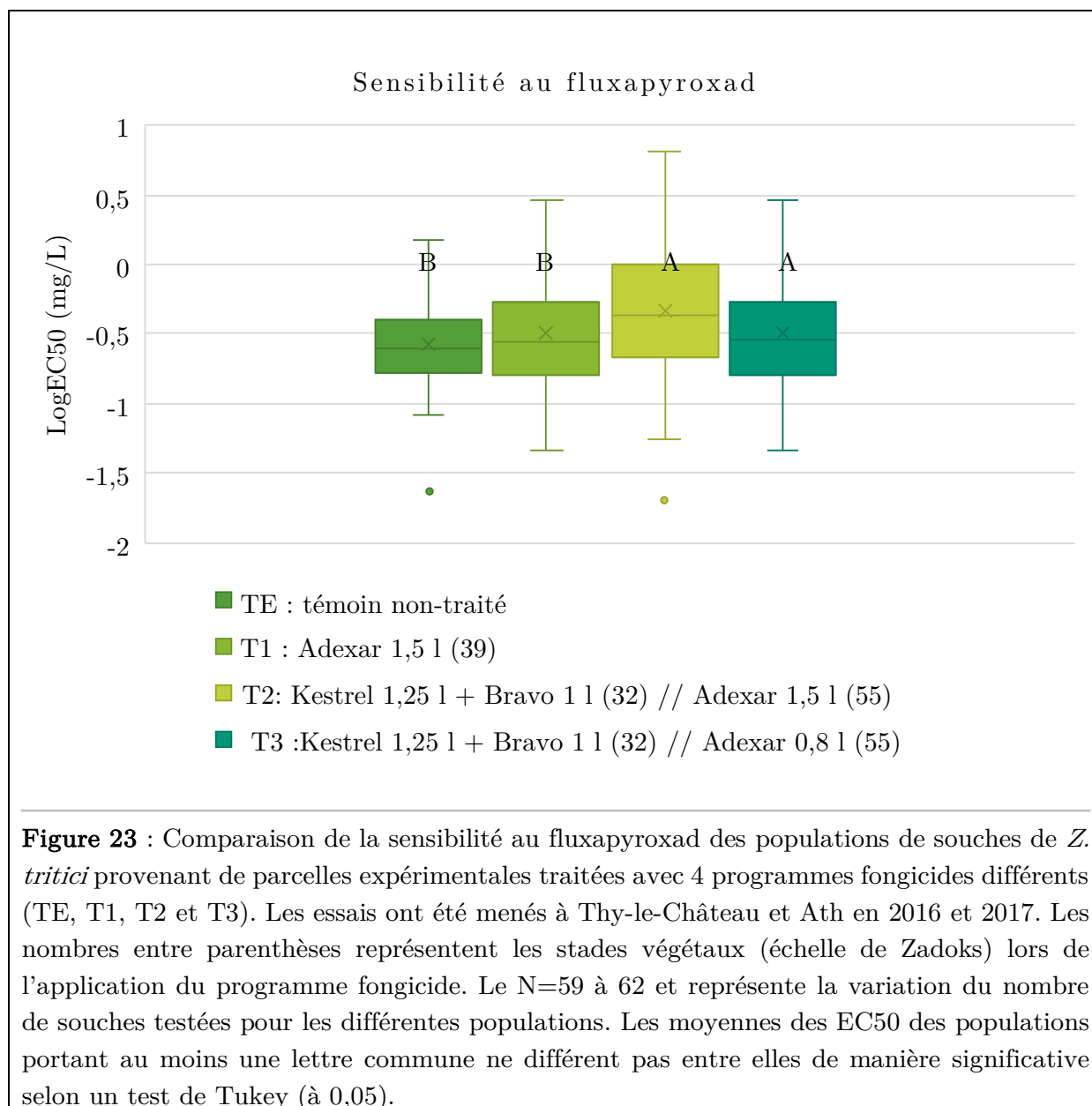
Premièrement, une comparaison de la sensibilité au fluxapyroxad des populations de *Z. tritici* présentes avant et après l'introduction des produits SDHI de nouvelle génération sur le marché belge a été réalisée. Pour cela, deux populations de souches ont été formées au sein de la collection. Une première population comprend 63 souches isolées à partir de feuilles non-traitées récoltées en 2008 et 2009. Ces souches datent d'avant l'apparition des produits fongicides SDHI de nouvelle génération et est donc nommée la **baseline**. Une deuxième population comprend 61 souches isolées à partir de feuilles non traitées des années 2016 et 2017 (les souches TE, témoins) qui sont donc la population **non traitée actuelle**. L'observation graphique (figure 22) montre une différence entre la sensibilité moyenne des souches des deux populations. Les tests statistiques confirment que la population baseline est

significativement plus sensible au fluxapyroxad que la population actuelle (p-valeur < 0.001).



Ensuite, les valeurs moyennes d'EC50 (valeurs en logarithme de base 10 des EC50) pour quatre autres populations de souches séparées selon leur programme fongicide (TE (témoin), T1, T2 et T3) ont été comparées entre elles en utilisant le nombre total de souches (souches isolées dans les deux champs et les deux années conjointement) (figure 23) ou bien en sous-populations en comparant les quatre programmes pour chaque année et pour chaque champ séparément (figure 24).

L'observation du graphe (figure 23) comparant les quatre populations reprenant toutes les souches, affirme, par analyses statistiques, que seule la sensibilité des souches isolées à partir de la parcelle qui a subi le traitement T2 admet une moyenne significativement différente des autres populations ($p\text{-valeur} < 0.05$). Les valeurs d'EC50 obtenues pour les souches isolées de feuilles collectées dans les parcelles soumises au traitement T3, qui comprend une demi-dose pour le produit Adexar, ne sont pas significativement différentes de celles observées pour les souches issues de parcelles témoin et T1 ($p\text{-valeur} > 0,05$).



Les sous-populations de souches comparent la sensibilité moyenne des quatre programmes pour chaque année et pour chaque champ séparément. Les analyses statistiques nous confirment cependant uniquement une différence significative (p -valeur <0.01), lorsqu'on analyse la sous-population de Ath 2017, de la sensibilité moyenne des souches isolées des parcelles du programme T2 (figure 24) par rapport à celle des trois autres populations. Aucun des autres tests de Tukey (à 0,05) ne rejette l'hypothèse nulle montrant ainsi qu'il n'y a aucune différence statistique entre les groupes de comparaison.

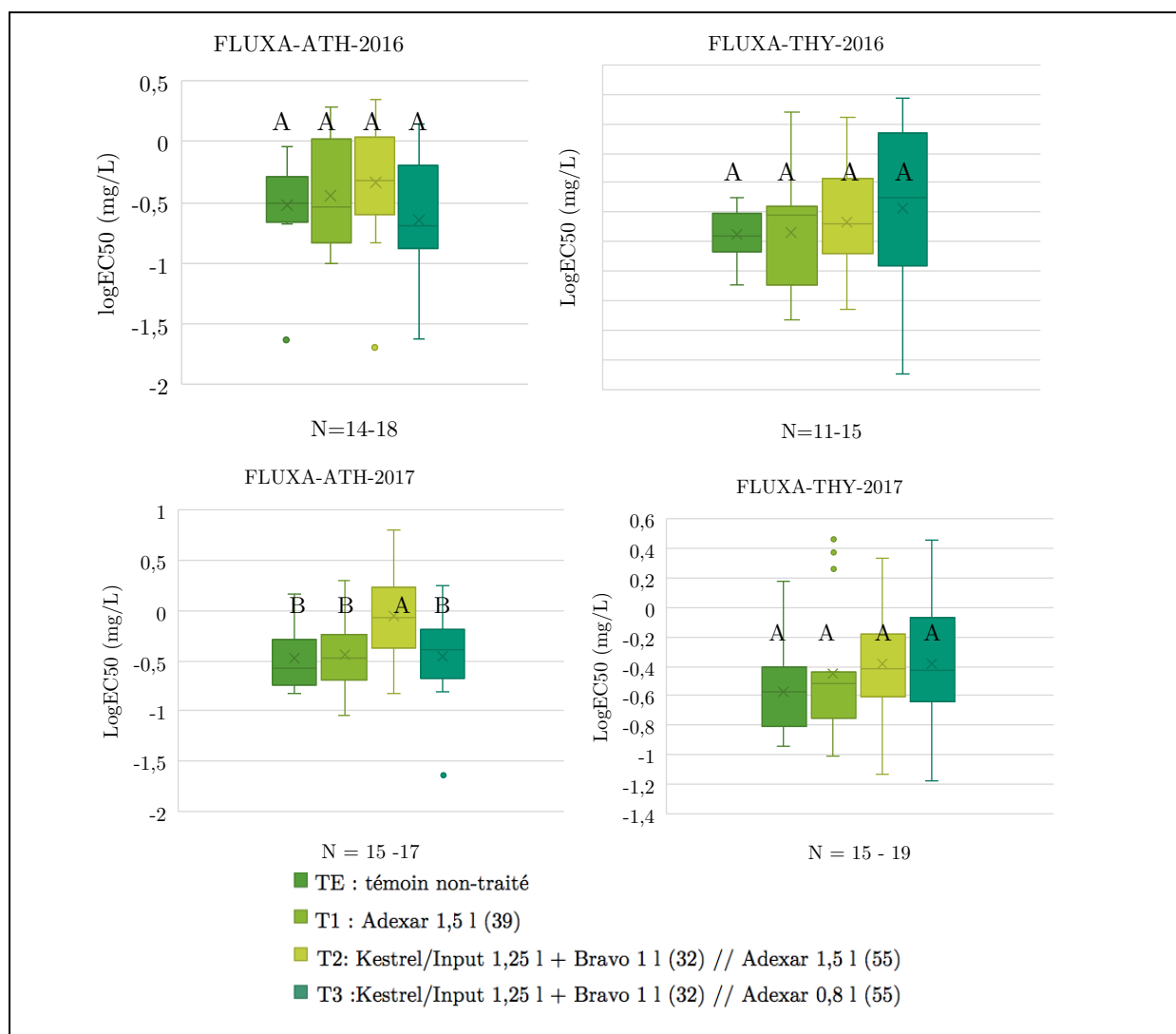
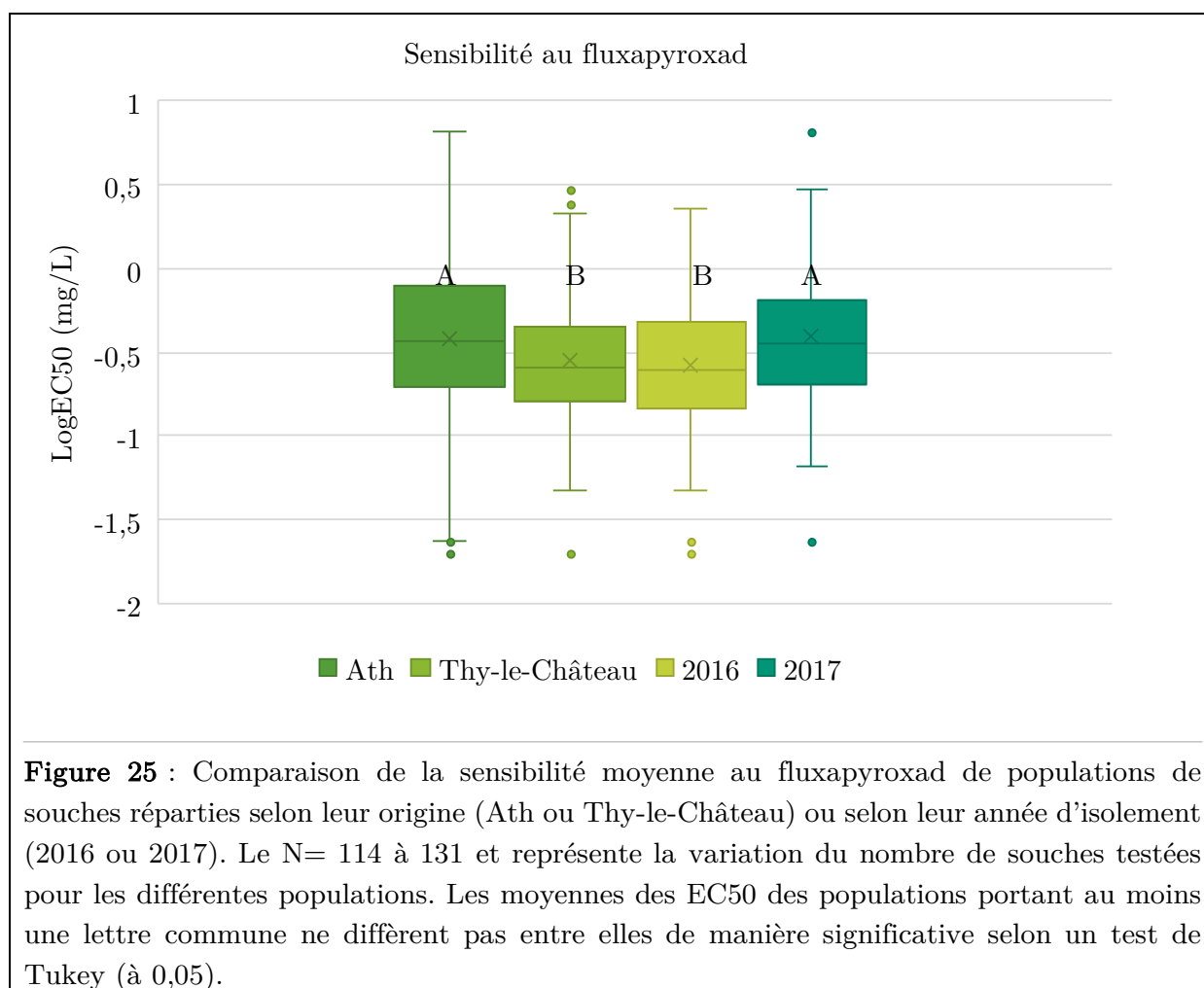


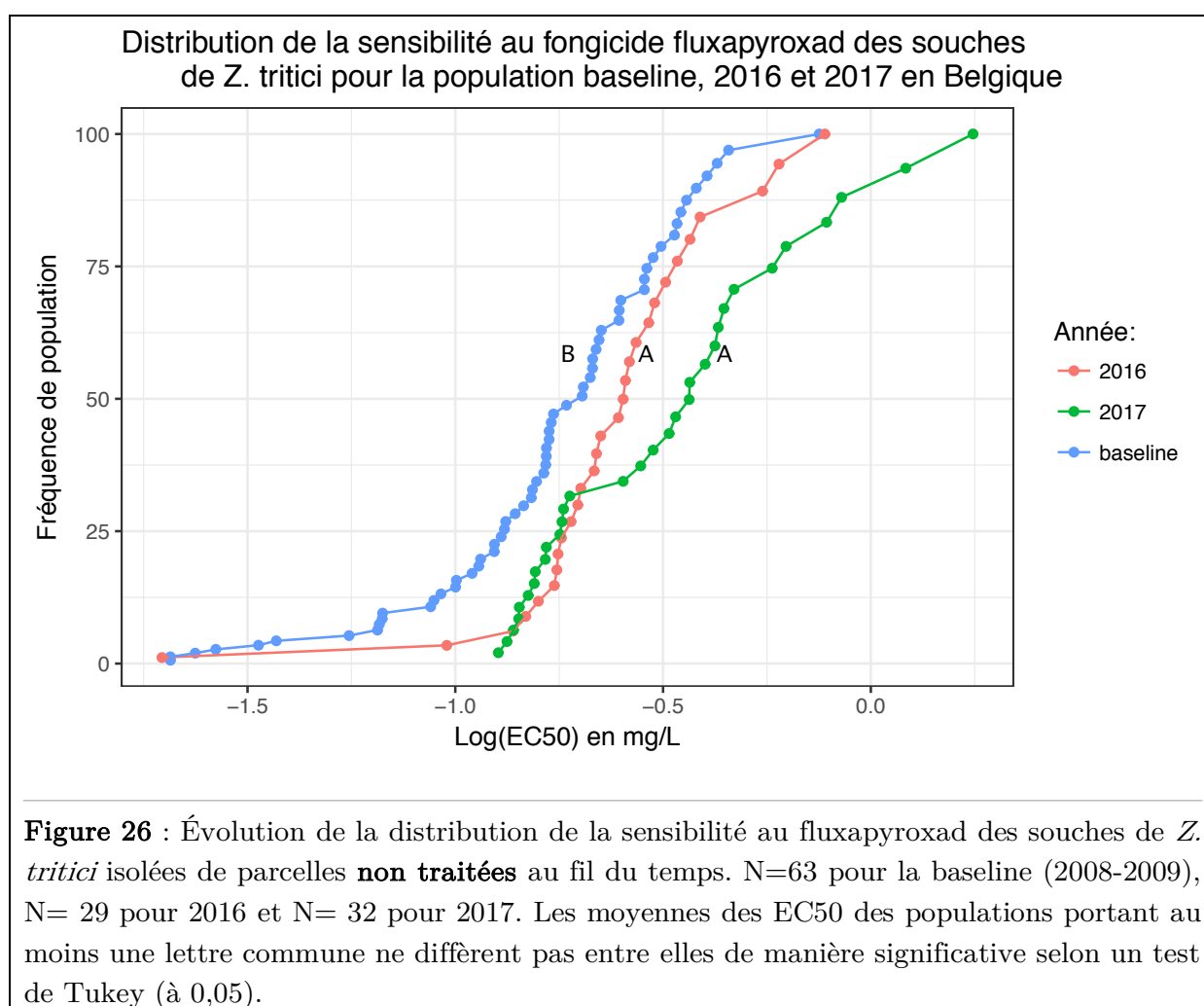
Figure 24 : Comparaison de la sensibilité au fluxapyroxad de quatre populations de souches de *Z. tritici* classées en fonction des modalités de traitements fongicides appliquées dans leurs parcelles expérimentales (TE, T1, T2 et T3). Les populations sont formées à partir de toutes les souches d'un champ ou d'une année d'expérimentation. Le N représente la variation du nombre de souches testées pour les différentes populations. Les moyennes des EC50 des populations portant au moins une lettre commune ne diffèrent pas entre elles de manière significative selon un test de Tukey (à 0,05).

Ensuite, des populations de souches sont formées selon leur année ou leur champ d'essai (figure 25). Par exemple, une population est formée pour le champ de Ath qui comprend toutes les souches de ce champ pour 2016 et 2017 et de même avec Thy-le-Château ou pour les deux années pour uniquement le champ de Ath ou celui de Thy-le-Château. La sensibilité moyenne au fluxapyroxad des souches de la population de 2016 est significativement différente de celle de 2017 (p -valeur < 0.01). Il y a également une différence significative entre la sensibilité moyenne au fluxapyroxad des souches du champ de Ath par rapport à celle de Thy-le-Château (p -valeur < 0.05).



Un aperçu de l'évolution de la sensibilité de la population de souches non-traitées face au fluxapyroxad au fil du temps (figure 26) permet de se rendre compte de la modification du comportement des souches face aux fongicides au cours des saisons. Trois populations de souches sont formées selon leur année d'isolement : baseline (toutes les souches de 2008 et 2009), 2016 (toutes les souches de 2016 isolées de parcelles non traitées) et 2017 (toutes les souches de 2017 isolées de parcelles non traitées). Le test statistique de Tukey (à 0,05) confirme que la sensibilité moyenne

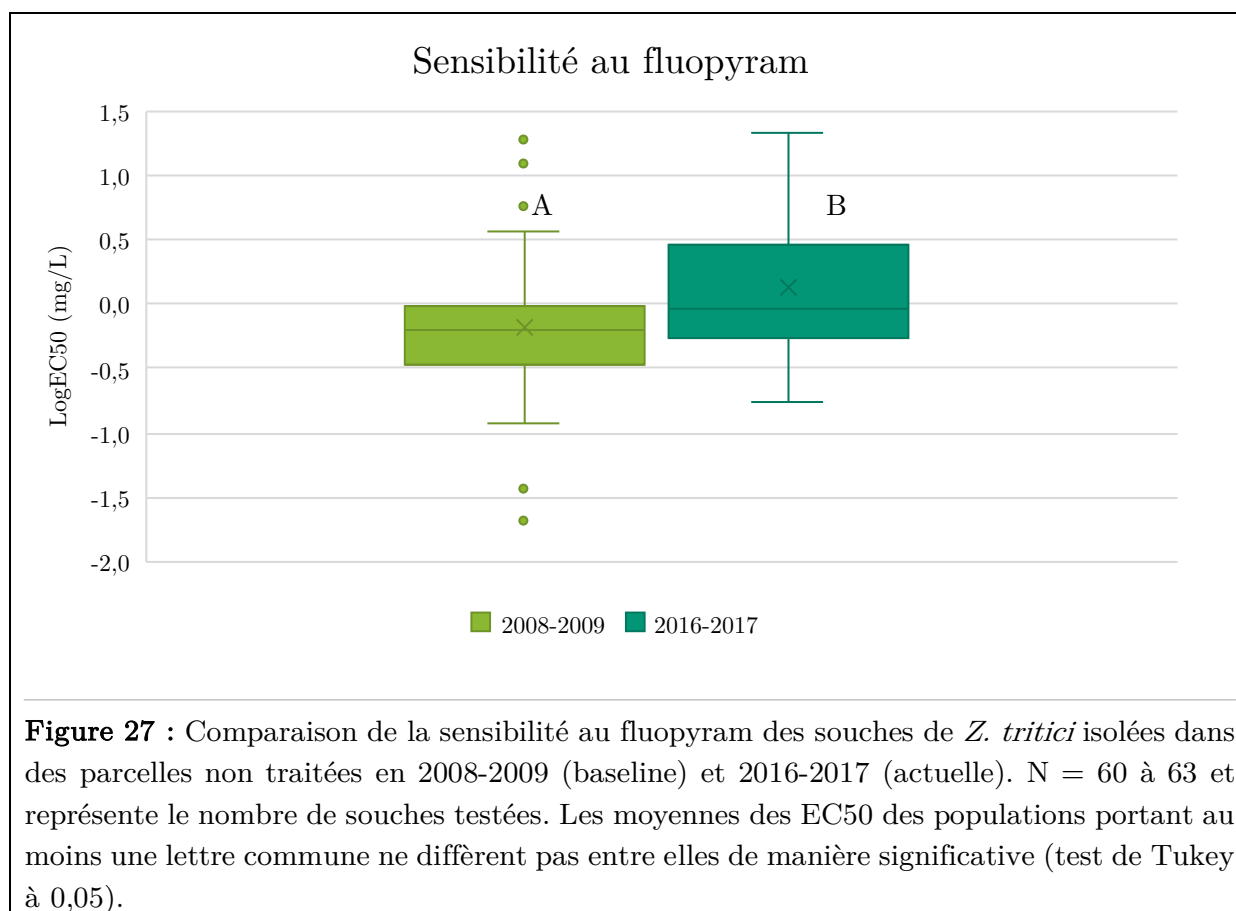
des populations de souches isolées en baseline (2008 et 2009) est significativement ($p\text{-valeur}<0.05$) différente des populations de 2016 et de 2017. Les sensibilités des populations de souches de 2016 et 2017 ne sont quant à elles pas significativement différentes ($p\text{-valeur}>0,05$). Toutefois, l'observation graphique a pu constater que l'écart entre les valeurs d'EC50 des souches de 2016 et 2017 est faible pour des valeurs inférieures mais devient plus important lorsque les valeurs d'EC50 deviennent plus élevées. Une translation parallèle des courbes de populations de souches vers des valeurs de $\log(\text{EC50})$ plus élevées signifie une translation vers plus de résistance face aux fongicides. On constate que les distributions sont de type bimodale et les valeurs d'EC50 évoluent progressivement dans la population.



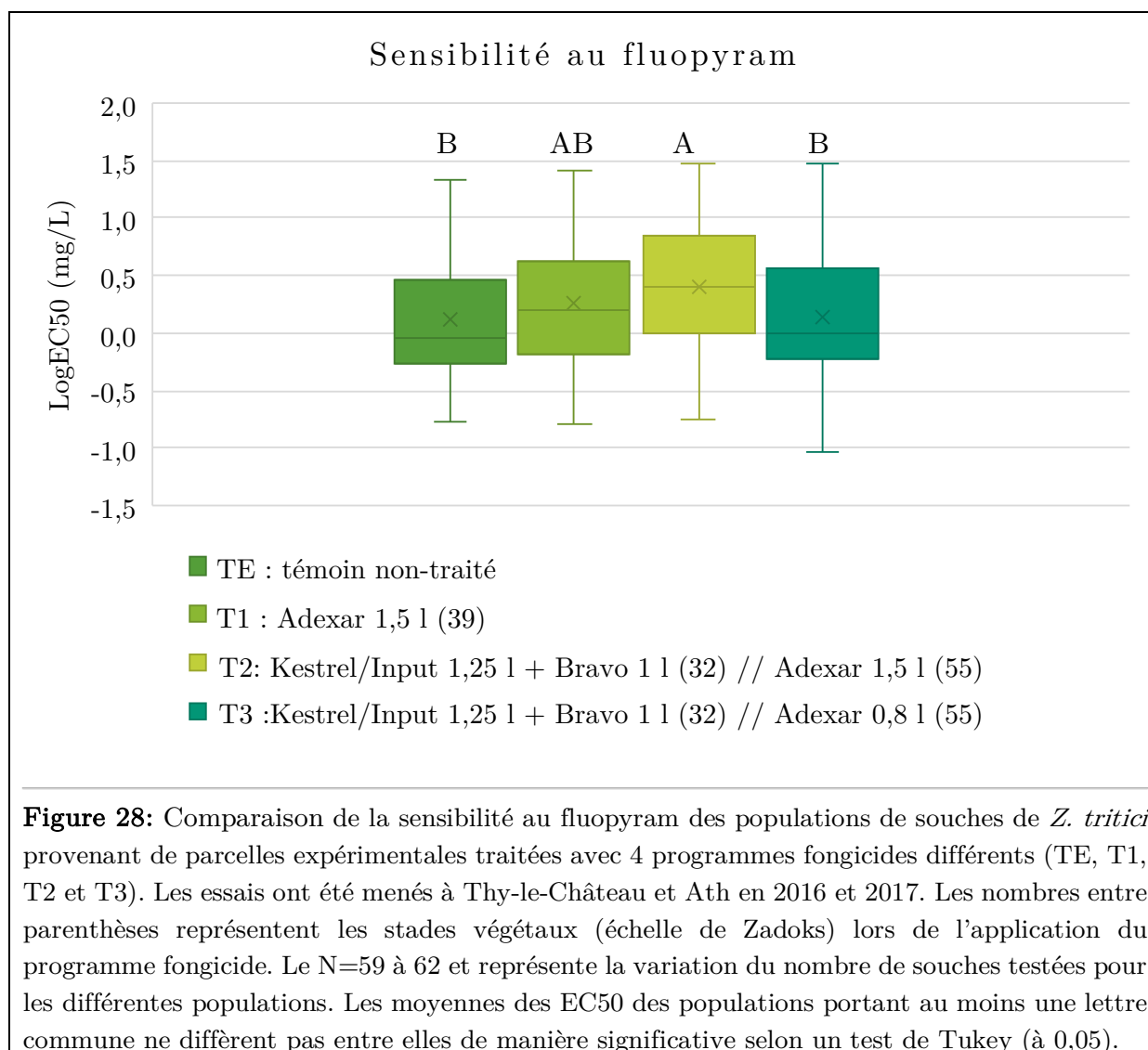
III.3.2 Sensibilité des souches au fluopyram

Les mêmes analyses ont été réalisées pour la sensibilité des souches au fluopyram. La sensibilité de la population baseline (qui comprend les souches isolées en 2008 et 2009) est comparée à celle actuelle (comprenant les souches isolées de parcelles non traitées en 2016 et 2017). L'analyse graphique (figure 27) montre que

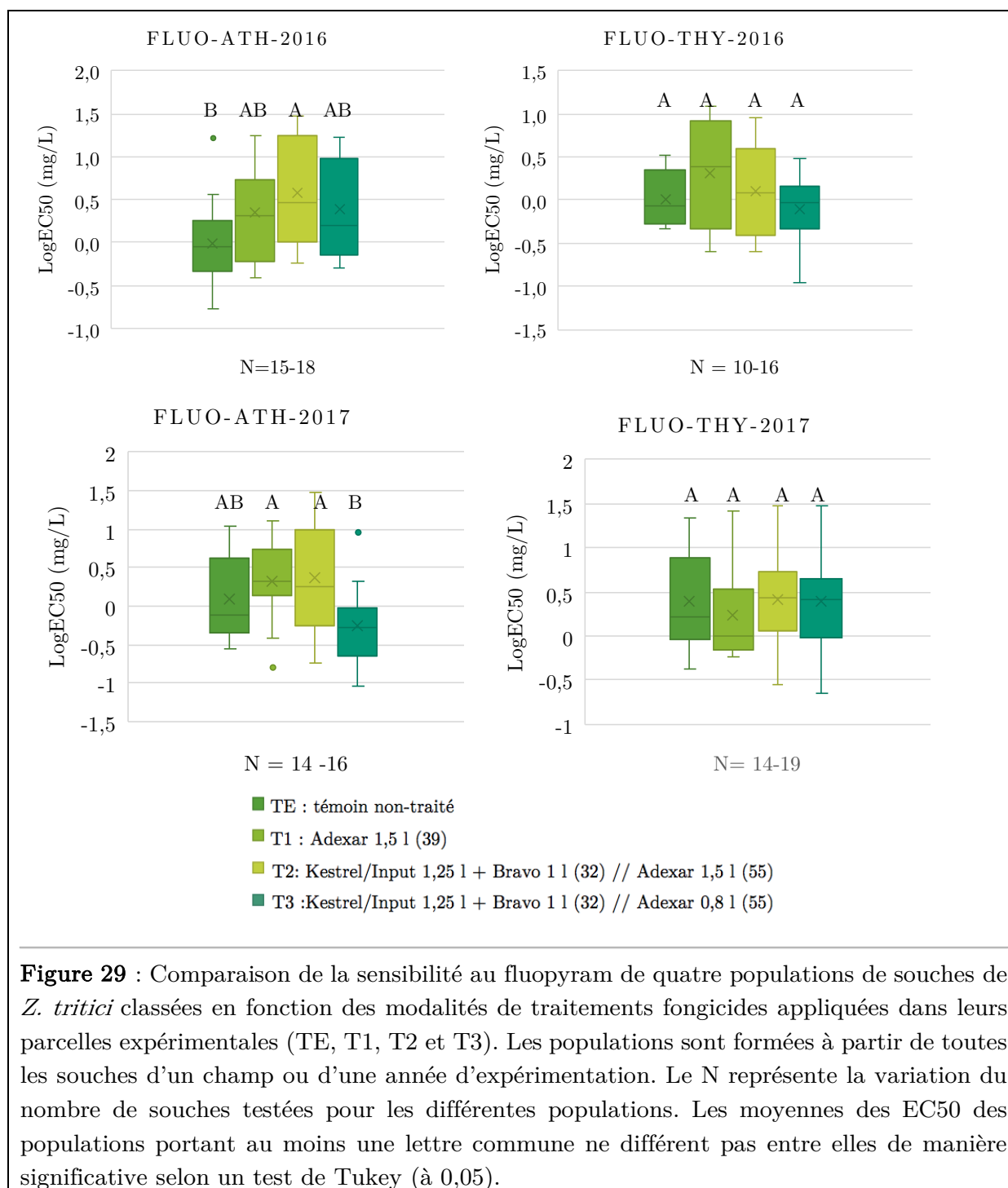
les souches sont plus sensibles dans la population baseline que dans l'actuelle. Les analyses statistiques confirment une différence significative entre les moyennes des deux populations (p -valeur <0.01).



Ensuite, une comparaison entre quatre autres populations de souches séparées selon leur programme fongicide (TE (témoin), T1, T2 et T3) est réalisée. L'analyse graphique (figure 28) suggère des différences entre la sensibilité moyenne des souches isolées dans des parcelles ayant reçues des programmes fongicides différents. Selon le test de Tukey, la sensibilité moyenne des souches isolées des parcelles du programme T2 qui comprend les deux traitements à pleine dose est significativement différente (p -valeur $<0,05$) de TE et T3 mais pas du T1. La sensibilité moyenne des souches isolées à partir du programme T3, qui comprend une dose réduite en produit Adexar pour le deuxième passage de fongicides, n'est **significativement pas différente** de celle des populations de souches isolées à partir des parcelles témoins (TE) non traitées et des parcelles T1 (avec un seul passage de fongicides).



Les sous-populations de souches qui comparent la sensibilité moyenne des quatre programmes pour chaque année et pour chaque champ séparément montrent plusieurs différences (figure 29). Pour les données de Ath en 2016, la sensibilité des souches provenant du programme T2 diffère significativement de celle des souches isolées du programme TE (p -valeur <0.05) mais pas des programmes T1 et T3. Pour les données de Ath en 2017, la sensibilité des souches isolées à partir des parcelles du programme T3 est significativement différente (p -valeur $<0,05$) des programmes T1 et T2 mais n'est significativement pas différente du TE. Les comparaisons de sensibilité des souches dans le champ de Thy-le-Château ne révèlent aucune différence significative entre les souches isolées des différents programmes fongicides.



La sensibilité moyenne au fluopyram ont été comparée entre les populations de souches isolées à partir d'un champ d'essai ou d'une année précise (figure 30). Aucune différence significative (p -valeur=0,824) n'est constatée entre la sensibilité moyenne de toutes les souches isolées à Ath et celle à Thy-le-Château. Le même constat est observé pour la comparaison de sensibilité moyenne de toutes les souches isolées en 2016 ou en 2017 (p -valeur=0,365).

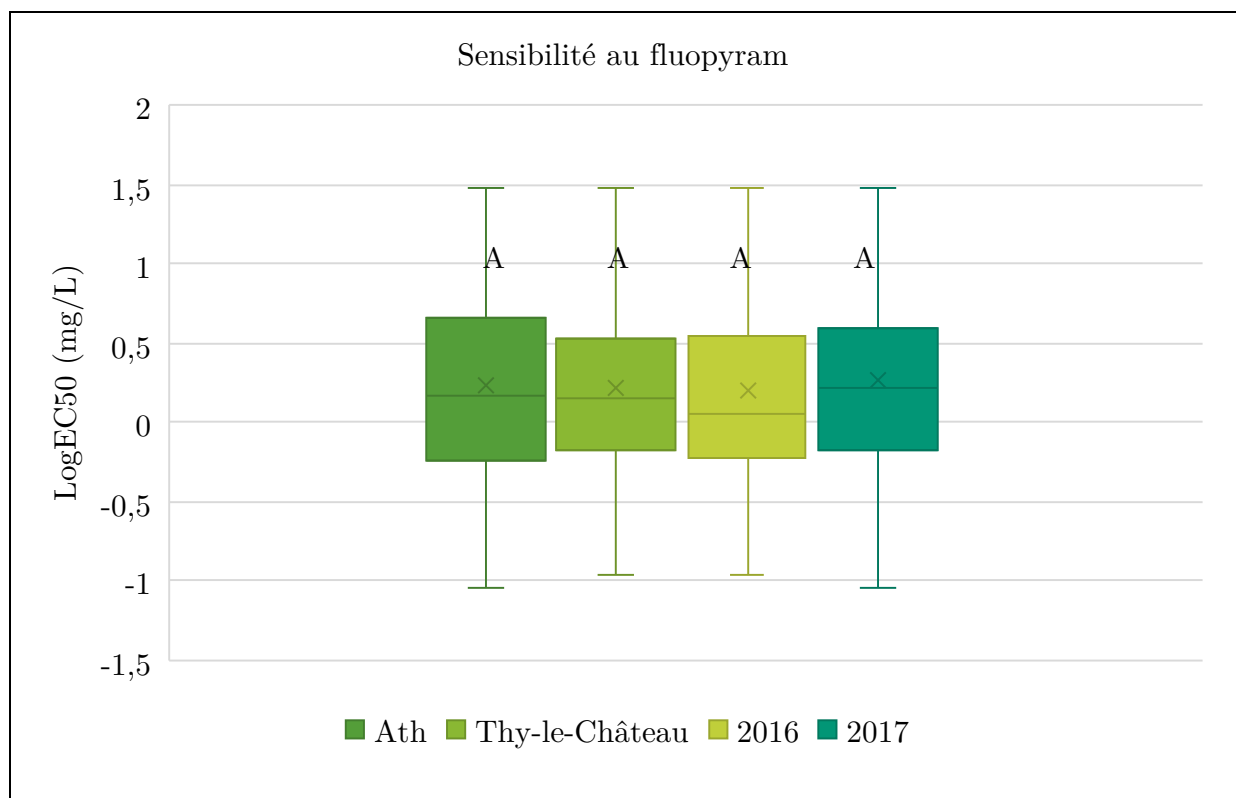


Figure 30 : Comparaison de la sensibilité moyenne au fluopyram de populations de souches réparties selon leur origine (Ath ou Thy-le-Château) ou selon leur année d'isolement (2016 ou 2017). Le N=116 à 131 et représente la variation du nombre de souches testées pour les différentes populations. Les moyennes des EC50 des populations portant au moins une lettre commune ne diffèrent pas entre elles de manière significative selon un test de Tukey (à 0,05).

Un graphe montrant l'évolution de la sensibilité des souches face au fluopyram au fil du temps (figure 31) permet de se rendre compte de la modification du comportement des souches **non-traitées** face aux fongicides. Les populations sont donc formées avec des souches isolées de parcelles non-traitées et selon leur année d'isolement : baseline (2008-2009), 2016 et 2017. Une différence significative (test de Tukey à 0,05) est confirmée entre la population baseline et celle de 2017. Par contre, aucune différence significative n'est montrée entre la sensibilité au fluopyram de la population baseline comparée à celle de 2016, de même que la sensibilité de 2016 comparée à celle de 2017. On constate que les distributions sont de type bimodale.

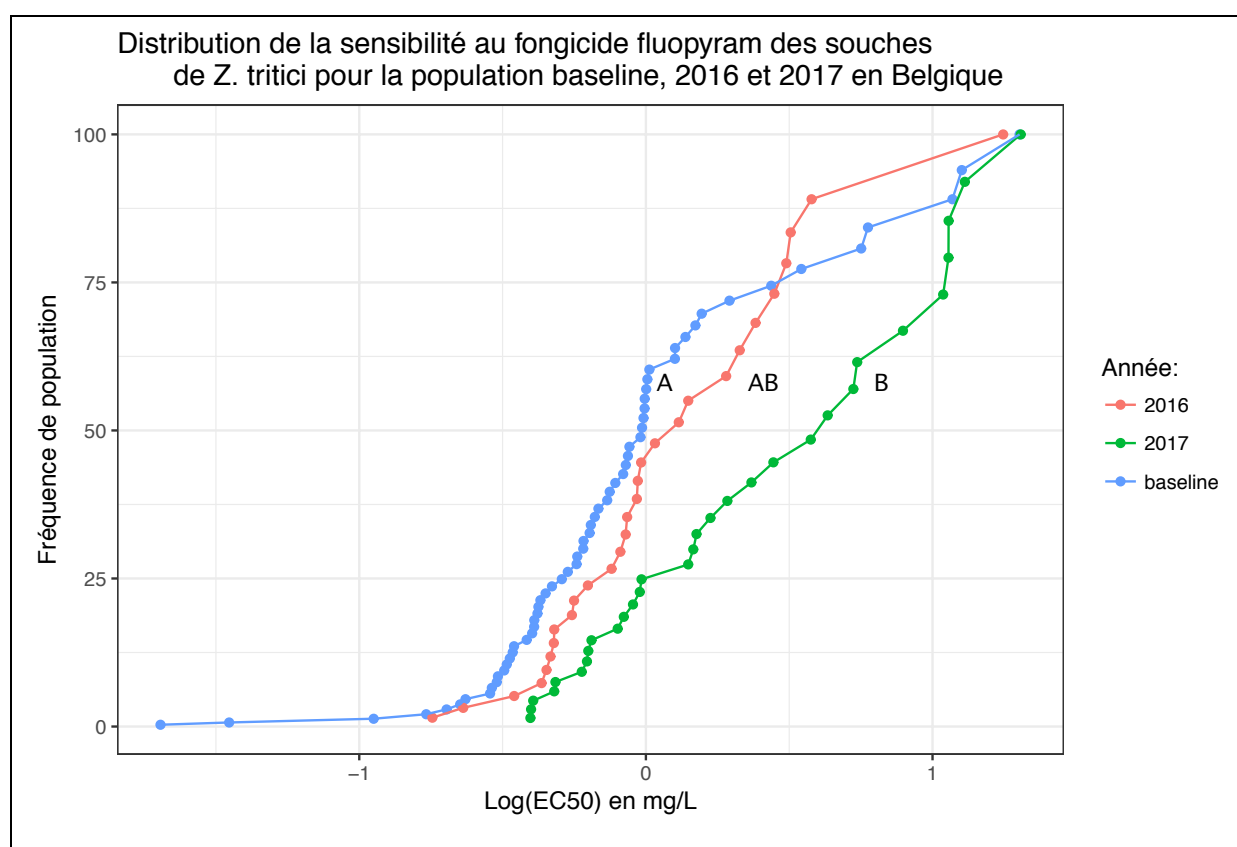
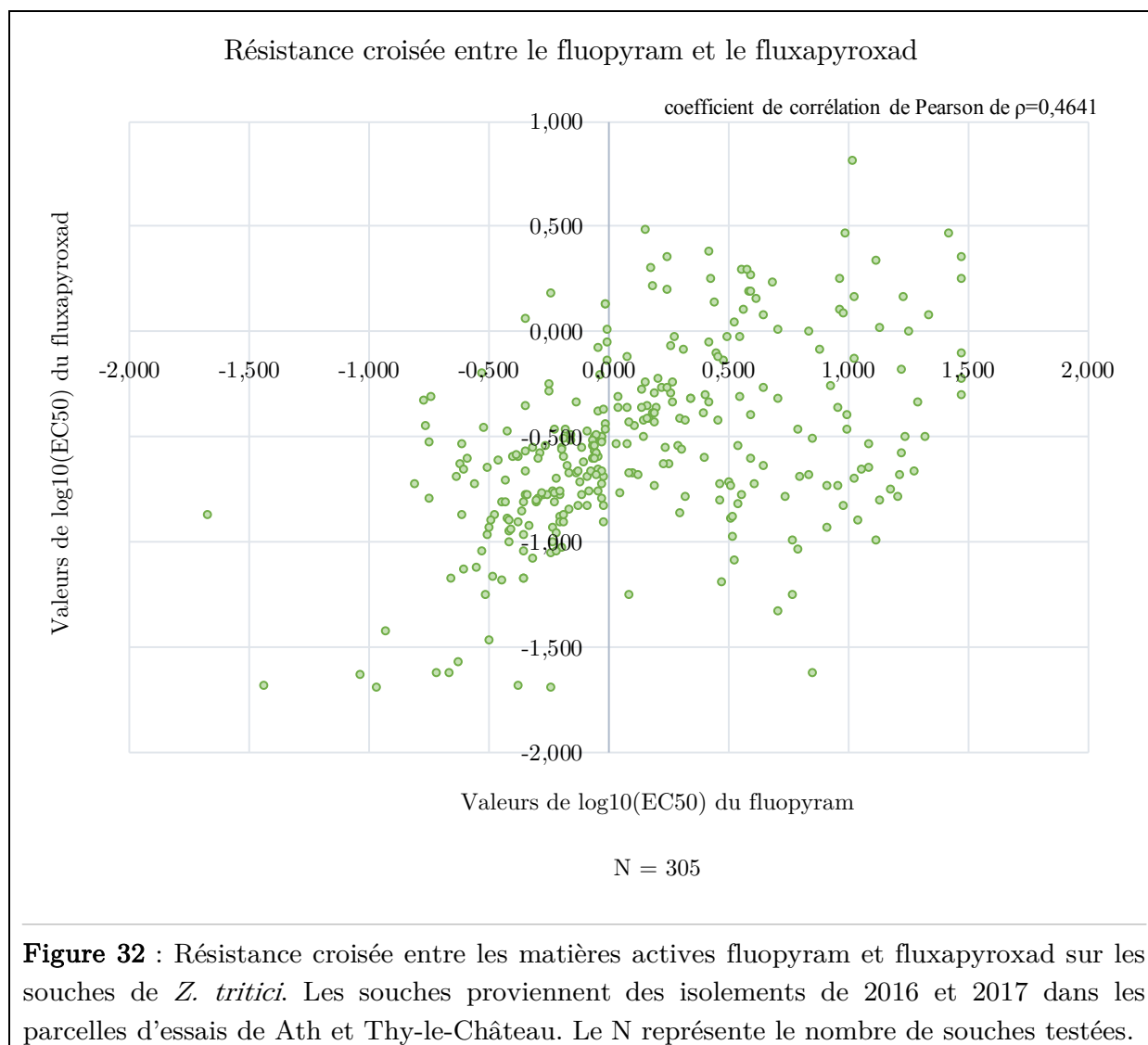


Figure 31 : Évolution de la sensibilité au fluopyram (en $\log_{10}(\text{EC}_{50})$) des souches de *Z. tritici* isolées de champs non traités au fil du temps (N = 63 pour la baseline (2008-2009); N= 29 pour 2016 ; N = 31 pour 2017). Les moyennes des EC₅₀ des populations portant au moins une lettre commune ne diffèrent pas entre elles de manière significative selon un test de Tukey (à 0,05).

III.3.3 Résistance croisée entre les matières actives

La résistance croisée entre les deux matières actives a été mesurée en évaluant la relation linéaire entre les deux variables. Le graphe de nuage de points (figure 32) reprend pour chaque souche les valeurs d'EC50 (valeurs en log10) des deux matières actives. Les niveaux de sensibilité des souches face aux deux molécules sont significativement corrélées avec un coefficient de corrélation de Pearson de $\rho=0,4641$.



III.4. CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES SÉQUENCES

L'objectif de la caractérisation moléculaire est de mettre en relation d'éventuelles mutations au niveau du gène cible du fongicide avec un profil de résistance à ce fongicide. Le séquençage d'une partie du gène de la succinate déshydrogénase (la sous-unité C nommée SDH-C) a été réalisé pour 30 souches de septoriose choisies au sein de la collection. Comme expliqué dans la partie expérimentale, elles ont été sélectionnées parmi quatre catégories en fonction du comportement des souches face aux 4 molécules fongicides: le fluxapyroxad et le fluopyram ainsi que le tébuconazole et prothioconazole (analysés dans le cadre du mémoire par Lucas Yzerbyt).

Pour rappel, les quatre catégories sont les suivantes :

- Souches résistantes aux fluxapyroxad (et fluopyram)
- Souches résistantes aux fluxapyroxad et prothioconazole (et fluopyram)
- Souches résistantes aux prothioconazole (et tébuconazole)
- Souches sensibles (EC₅₀ faibles pour tous les fongicides)

Les mutations ont été recherchées dans les parties du gène qui donnent un ARNm en utilisant la séquence SDH-C de la souche sauvage *Z. tritici* de référence (Mycgr3G74581) trouvée sur le site EnsemblFungi (<https://fungi.ensembl.org/html>). **Cinq mutations différentes** ont pu être relevées (tableau 6) au sein des souches belges de *Z. tritici* : C-N33T , C-N34T, C-I29V, C-F23V et C-W80S. Les mutations C-I29V et C-F23S sont retrouvées dans des souches qui présentent de faibles valeurs d'EC₅₀ (en dessous ou proche de la moyenne) tandis que la mutation C-W80S est retrouvée dans une souche qui admet des valeurs d'EC₅₀ plus élevées (2,89 pour le fluxapyroxad et 9,77 pour le fluopyram) que les valeurs moyennes.

Tableau 6 : Souches belges de *Z. tritici* et leurs valeurs d'EC50 lors des tests face au fluxapyroxad et au fluopyram ainsi que leurs mutations dans la sous-unité C du gène SDH. Les souches sont classées par ordre croissant de la valeur d'EC50 face au fluxapyroxad.

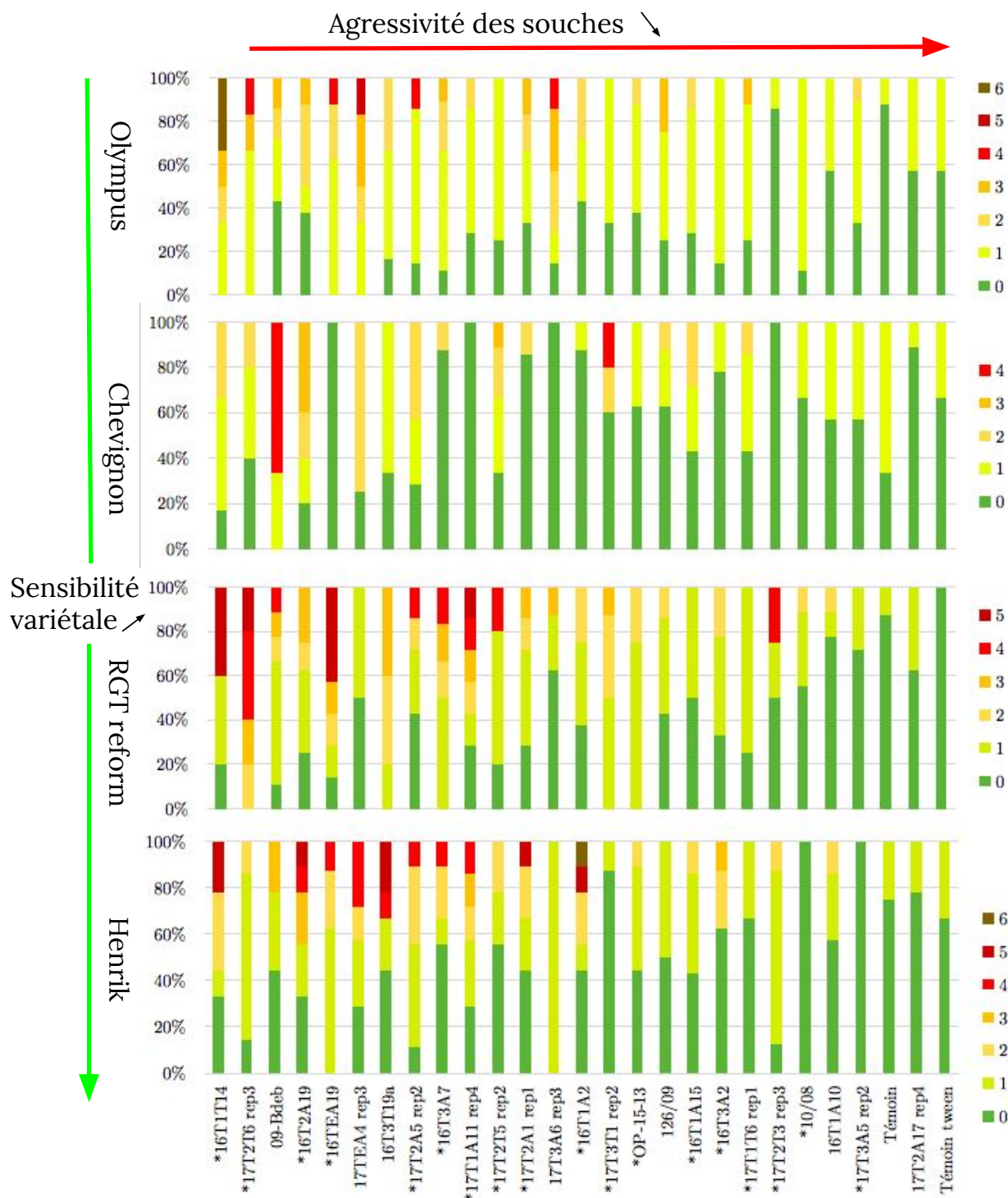
Profil de sensibilité aux fongicides (EC50 mg/L) des 30 souches belges de <i>Z. tritici</i> (2008, 2009, 2016 et 2017). Liste des souches avec les mutations retrouvées dans la sous-unité C du gène SDH ainsi les valeurs d'EC50 correspondantes testées au fluopyram et au fluxapyroxad.			
Souches	SDH-C	Fluxapyroxad*	Fluopyram*
17T3A5 rep2	I29V	0,023	0,092
16T3A2	F23S, I29V	0,055	1,240
10/08	N33T, N34T	0,056	0,311
126/09	rien	0,067	0,330
17T1A11 rep4	I29V	0,184	0,158
16T1A15	N33T, N34T	0,253	0,399
17T2A17 rep4	rien	0,293	0,181
17T1T6 rep1	rien	0,309	1,420
16T3A7	N33T, N34T	0,315	0,699
17T2T6 rep3	N33T, N34T	0,364	1,221
17TEA4 rep3	rien	0,503	1,831
17T2T3 rep1	N33T, N34T	0,591	30,000
17T3A6 rep3	rien	0,615	0,939
16TEA19	N33T, N34T	0,655	16,780
17T2A7 rep3	N33T, N34T	0,780	30,000
16T1A10	Séquençage raté	1,173	4,488
16T1T14	N33T, N34T	1,201	9,701
17T2T3 rep3	N33T, N34T	1,251	3,707
16T1A2	N33T, N34T	1,260	9,347
16T3T19a	rien	1,317	0,981
16T3T20	N33T, N34T	1,323	0,982
17T2T5 rep2	N33T, N34T	1,739	2,693
16T1A6	N33T, N34T	1,921	3,636
17T3T1 rep2	N33T, N34T	1,944	3,837
17T2A5 rep2	N33T, N34T	2,230	1,776
16T2A19	N33T, N34T	2,250	30,000
17T3T3 rep4	W80S	2,890	9,775
17T1T5 rep2	N33T, N34T	2,892	26,466
17T2A1 rep1	N33T, N34T	3,006	1,436
17T2A6 rep3	N33T, N34T	6,449	10,539
*valeur moyenne de 4 données d'EC50 par souche (2 répétitions techniques et 2 mécaniques)			
Souches sélectionnées pour leur profil insensible aux fluxapyroxad et prothioconazol			
Souches sélectionnées pour leur profil insensible aux fluxapyroxad et fluopyram			
Souches sélectionnées pour leur profil insensible aux tébuconazol et prothioconazol			
Souches sensibles aux quatre fongicides			

III.5. CARACTÉRISATION DES TRAITS D'AGRESSIVITÉ DES SOUCHES

Pour rappel, le but de l'expérience est de comparer les traits d'agressivité de 25 souches de septoriose dans les périodes sans pression fongicide. Les souches ont été choisies parmi celles précédemment analysées en biologie moléculaire afin de connaître, en plus de leur profil de sensibilité face aux fongicides et leur séquence d'ADN du gène SDH-C, leur agressivité. Les souches caractérisées par des périodes d'incubation et de latence courtes présentent, par hypothèse, un avantage sélectif dans les populations.

Parmi les 30 souches séquencées, 7 souches n'ont pas pu être testées pour leur valeur adaptative. Deux souches séquencées par la firme MACROGEN n'ont pas pu être testées dû à leur trop faible croissance lors des préparations d'inocula. Les séquences des 5 souches séquencées par la firme EUROFINS ont été analysées trop tardivement pour les introduire dans l'essai en serres.

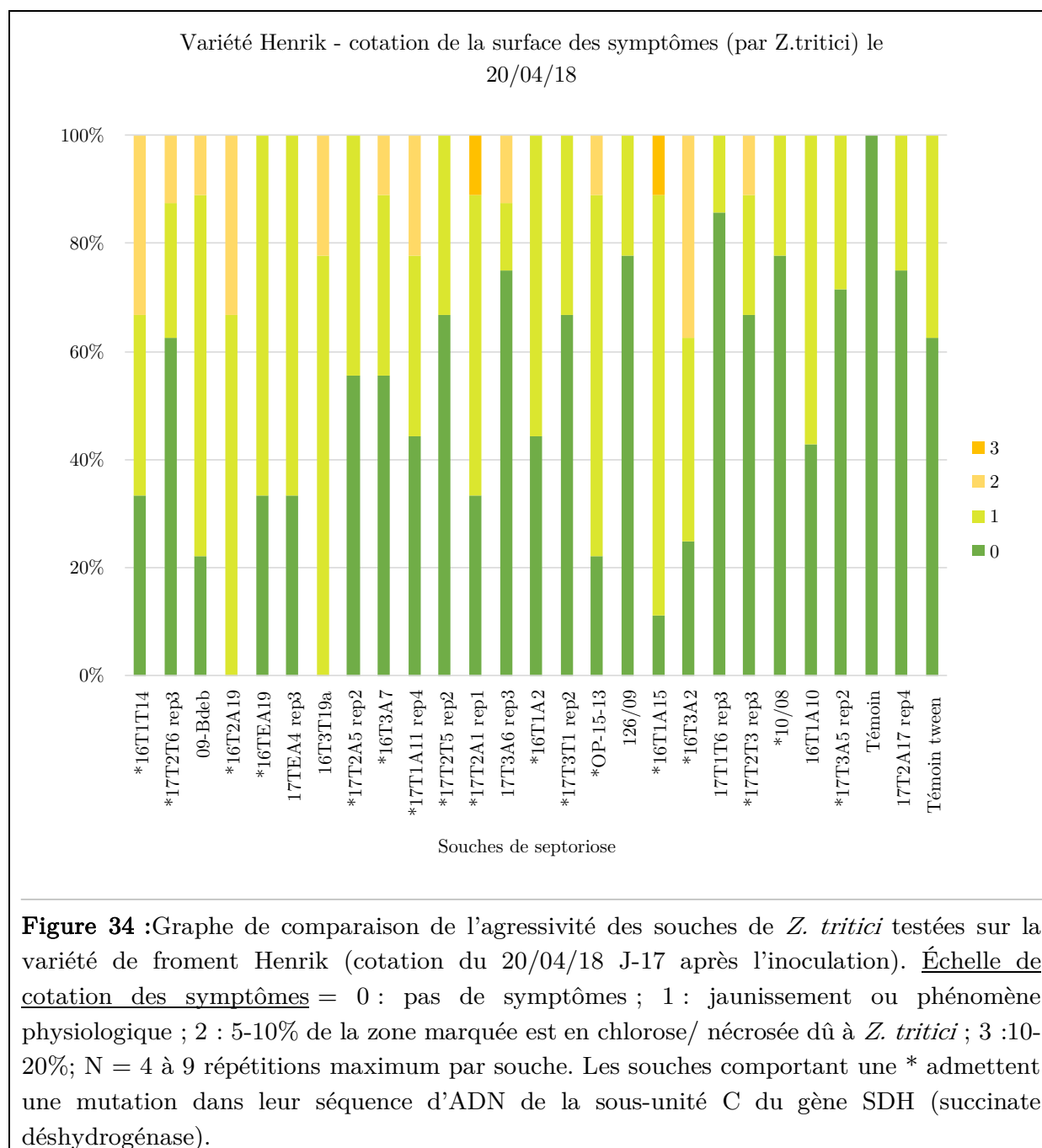
L'inoculation a été réalisée 24 jours après les semis sur 9 plantules des 4 variétés. Les premiers symptômes sont apparus 15 jours après l'inoculation. A partir de ce moment, les symptômes ont été évalués visuellement à cinq reprises (dates de cotation 1 à 5 : 20/04 ; 23/04 ; 25/04 ; 27/04 ; 30/04) sur les 972 feuilles en utilisant la clé de cotation. Une sénescence naturelle des plantules ainsi que des dégâts dus à l'humidité ont rapidement été observés sur certaines plantules. Ces plantules ont été déclassées. Les données de la première et dernière cotation (1 et 5) se sont avérées peu pertinentes. Les symptômes étaient peu visibles lors de la cotation 1 (uniquement des jaunissements) et la sénescence trop importante lors de la cotation 5 pour comparer les souches entre elles. Le manque de pertinence des données a conduit à se concentrer sur les résultats de la cotation 3 du 23/04 (18 jours après l'inoculation) et à comparer l'agressivité des souches en fonction uniquement du niveau de symptômes constatés. Pour chacune des variétés, les symptômes sont présentés par souche dans un histogramme de valeurs cumulées des cotations (figure 33).



Le classement d'agressivité des souches a été réalisé en additionnant les moyennes des symptômes de la cotation du 25/04 de chaque souche pour les 4 variétés. La souche **résistante irlandaise OP-15-13** qui comporte la mutation C-H152R qui confère une résistance élevée aux molécules SDHI est classée 16^{ième} plus « agressive » parmi les 25 souches. La souche française 09-Bdeb qui comporte la mutation S524T dans le gène CYP51 et confère une résistance élevée aux triazoles, est la troisième plus « agressive » et est un résultat intéressant dans l'étude du comportement des souches résistantes face à cette famille de fongicides. La souche classée **la plus « agressive »** est la 16T1T14 et admet une valeur moyenne d'EC50 plus élevée que la moyenne pour le fluxapyroxad. Cette souche a une EC50 élevée de 1,20 mg/L pour le fluxapyroxad comparativement à la moyenne de la population actuelle (2016-2017) qui est de 0,54 mg/L. Elle admet également une EC50 élevée de 9,70 mg/L pour le fluopyram comparé à la moyenne de 3,94 mg/L. Les souches comportant la mutation C-I29V sont réparties en 10 et 24^{ième} position. La souche avec les deux mutations C-I29V et C-F23S se positionne à la 19^{ième} place. Les souches comportant les mutations C-N33T et C-N34T sont réparties en 1, 2, 4, 5, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 21 et 22^{ième} position.

Des symptômes plus marqués sont constatés sur les variétés Henrik et RGT reform ce qui est cohérent avec leur profil plus sensible (- ou =) à la septoriose. Pour la variété Chevignon (+) et Olympus (++), les symptômes sont moins présents sur l'ensemble des souches. Les souches 09-Bdeb et 17T3T1 rep2 provoquent tout de même des symptômes de niveau 4 (20-40% de symptômes sur la zone) sur certaines feuilles de la variété Chevignon. Un plus grand nombre de souches provoquent des symptômes de niveau 4 ou supérieur sur la variété Olympus : 16T1T14, 17TEA4 rep3, 17T3A6 rep3, 17T2T6 rep3, 16TEA19 et 17T2A5 rep2.

Afin de confirmer les souches les plus agressives, une comparaison des souches a été examinée pour la variété Henrik uniquement lors des cotations 2 (figure 34) et 4 (figure 35).



L'apparition de symptômes de niveau 2-3 est constatée pour certaines souches et notamment sur les 4 plus agressives dès la cotation du 20/04. La souche irlandaise OP-15-13 n'est de nouveau pas la souche la moins agressive et admet même des symptômes de niveau 2 lors de cette cotation. Cette dernière admet des symptômes de niveau 3 (40-60% de la zone touchée) lors de la cotation du 27/04. Des pycnides ont été repérés sur la souche 16T2A19 lors de la cotation 4 du 27/04.

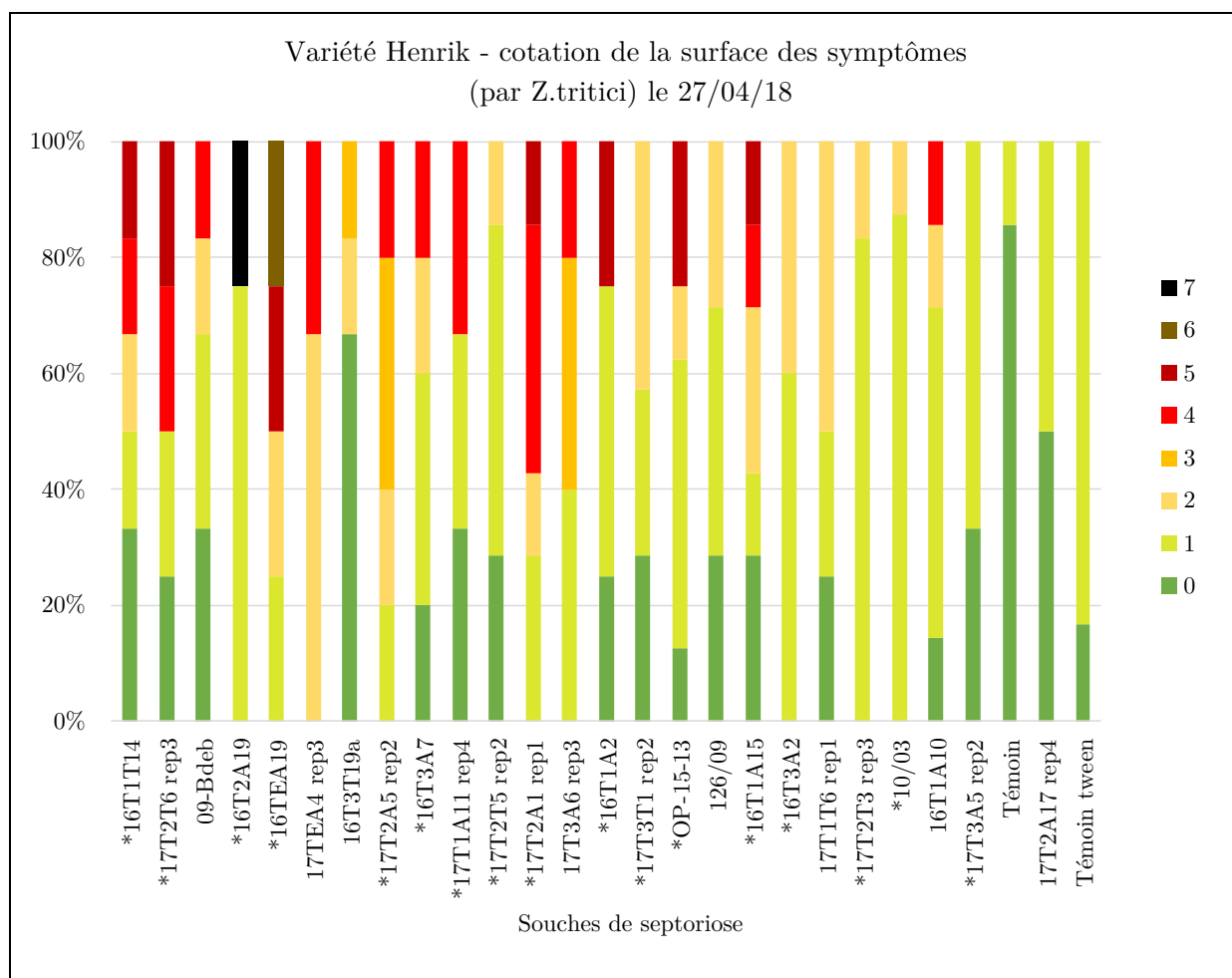


Figure 35: Graphe de comparaison de l'agressivité des souches de *Z. tritici* testées sur la variété de froment Henrik (cotation du 27/04/18 J-21 après l'inoculation). Échelle de cotation des symptômes = 0 : pas de symptômes ; 1 : jaunissement ou phénomène physiologique ; 2 : 5-10% de la zone marquée est en chlorose/ nécrosée dû à *Z. tritici* ; 3 : 10-20% ; 4 : 20-40% ; 5 : 40-60% ; 6 : 60-90% ; 7 : apparition de pycnides . N = 4 à 9 répétitions maximum par souche. Les souches comportant une * admettent une mutation dans leur séquence d'ADN de la sous-unité C du gène SDH (succinate déshydrogénase).

Le nombre élevé d'échantillons déclassés ne permet pas de tirer de conclusions et de comparer correctement les souches entre elles. Les résultats ressortis de cet essai ne sont pas ceux espérés mais peuvent mettre sur la piste d'expériences futures.

IV. DISCUSSION

IV.1. RÉSISTANCES AUX SDHI EN WALLONIE

Le premier objectif de ce mémoire consistait à évaluer le **niveau de la résistance** aux molécules fongicides SDHI dans les populations belges de l'agent pathogène *Z. tritici*. Pour ce faire deux populations de souches ont été comparées. La première, la population « baseline » a été obtenue en isolant des souches sur des feuilles prélevées dans des champs non traités en 2008 et 2009 avant que les nouvelles molécules SDHI ne soient introduites en Wallonie. Pour rappel, les deux principaux fongicides SDHI utilisés en Wallonie, le bixafen et le fluxapyroxad, ont été autorisés au niveau de l'Union Européenne (UE)²¹ en 2009²² et 2013²³ respectivement. Avant 2008, seul le boscalid était utilisé en Wallonie. La deuxième population utilisée pour la comparaison contenait uniquement des souches isolées sur des feuilles prélevées sur deux sites, Ath et Thy-le-Château en 2016 et 2017, dans des parcelles non traitées aux fongicides. La comparaison entre deux populations issues de feuilles prélevées dans des parcelles non traitées permet de limiter les biais dus à la sélection directe par des programmes fongicides différents. On observe que la résistance moyenne mesurée pour la population « baseline » est statistiquement inférieure à celle de la population provenant des échantillons de 2016 et 2017 pour deux molécules SDHI testées : le fluopyram et le fluxapyroxad. La différence de sensibilité observée montre que **l'application des fongicides SDHI en champs exerce bien une pression de sélection** sur la population pathogène et fait évoluer sa résistance moyenne face à ces fongicides en quelques saisons culturales. L'utilisation des produits SDHI en Wallonie n'a cessé d'augmenter si bien qu'à ce jour la majorité des céréaliers les utilisent une fois par saison pour la protection des blés (recommandations dans les avertissements réalisés par le Centre pilote wallon des céréales et oléo-protéagineux (CEPICOP). https://centrespilotes.be/fr/centres_pilotes/cepiscop).

La mesure de la sensibilité des souches de la population baseline de la présente étude a dévoilé des valeurs élevées d'EC50. Cela prouve qu'il y avait déjà des génotypes résistants à cette période. En effet, dans les champs ne subissant pas de

²¹ L'évaluation et l'autorisation des substances actives se font au niveau européen. L'évaluation des produits phytopharmaceutiques en vue de leur mise sur le marché se fait au niveau belge via un comité d'agrément.

²² Règlement d'exécution (UE) No 6771/2009 de la commission portant sur l'approbation de la substance active bixafen en septembre 2009.

²³ Règlement d'exécution (UE) No 589/2012 de la commission portant sur l'approbation de la substance active fluxapyroxad en juillet 2012.

pression de sélection par des fongicides, des génotypes résistants peuvent être trouvés à très basse fréquence, en raison de la haute capacité de dispersion reconnue chez *Z. tritici* (Kema *et al.*, 1997) ou des mutations spontanées qui peuvent se produire lors de la reproduction (Zhan et McDonald, 2004). Il est aussi probable que la population baseline ait déjà été influencée par l'utilisation du fongicide boscalid (SDHI d'ancienne génération) qui était utilisé en Belgique depuis 2007²⁴ à faible fréquence. Plusieurs auteurs ont mentionné que des mutants résistants présents dans la population pouvaient être favorisés et se répandre particulièrement rapidement dans les populations subissant une pression fongicide continue (Brent, 1995 ; Milgroom *et al.*, 1997 ; Vendite et Ghini, 1999). En Irlande du Nord, McCartney *et al.* (2007) avaient constaté une augmentation de la fréquence de la mutation G143A dans des champs subissant des traitements à base de strobilurines provoquant une évolution rapide du niveau de résistance de *Z. tritici* d'une saison à l'autre. La même tendance avait également été constatée au Royaume-Uni et dans le reste de l'Irlande (Fraaije *et al.*, 2005a). En seulement une dizaine d'années, la mutation ponctuelle (G143A au niveau du cytochrome B) du gène mitochondrial s'était propagée dans l'ensemble des populations européennes suite à l'utilisation des strobilurines (Cheval *et al.*, 2017) et a causé la perte du contrôle de la maladie par cette famille de fongicides (Gisi *et al.* 2002). Bien que ces études portent sur une famille de fongicides et que la mutation G143A porte sur un gène mitochondrial qui confère à elle seule une résistance totale aux strobilurines, un parallélisme peut être établi avec l'évolution de la résistance de *Z. tritici* aux SDHI qui sont également des fongicides uni-sites.

Lorsque la population obtenue avec tous les échantillons de 2016 (issus de parcelles traitées et non traitées) est comparée à la population de 2017, une différence de sensibilité moyenne est constatée uniquement pour le fluxapyroxad. **La résistance moyenne de la population de souches de 2017 est plus élevée que celle de la population de 2016** pour ce produit. L'évolution de la résistance au SDHI dans les populations de septoriose évoluerait donc rapidement d'une saison culturale à l'autre. Des résultats sur l'année 2018 permettraient de renforcer cette hypothèse. Cependant, les résultats des cotations de la sévérité de la septoriose ont montré que la maladie avait été bien plus préjudiciable en 2016 qu'en 2017. Bien que Dooley *et al.* (2016) aient montré une relation inverse entre la sensibilité et la sévérité de la maladie, la présente étude suggère **qu'une pression parasitaire moindre -comme celle de 2017- pourrait permettre aux souches naturellement mutées et plus résistantes de mieux survivre**. En effet, une faible pression de la maladie engendre moins de concurrence entre les individus et pourrait permettre aux individus mutés

²⁴ Reconnaissance provisoire du boscalid durant 3 ans depuis 2003 et prolongée jusqu'en 2007 afin de finalement être acceptée par la Commission européenne en 2008 (Directive 44/2008 de la CE).

(plus résistants) de mieux se développer. L'étude de Van den Bosch *et al.* (2011) mentionne la même idée en expliquant que si la densité de souches du type sensible est élevée, il est peu probable que le nombre de mutants augmente considérablement, car une grande partie du tissu hôte est occupée par le type sensible plus compétitif. Une évolution de la sensibilité au fluopyram a été confirmée entre les populations de 2008-2009 et de 2016-2017 mais les observations n'ont pas permis de montrer de différence entre les années 2016 et 2017. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer l'impact saisonnier des traitements fongicides sur la sensibilité des souches à cette molécule. L'évolution plus « lente » de la résistance à cette molécule pourrait être aussi liée à une plus faible utilisation de ce produit en Wallonie.

Enfin, la sensibilité de la population de toutes les souches obtenues à Ath (traitées et non-traitées, 2016 et 2017) a été comparée à la population provenant de tous les échantillons de Thy-le-Château. Cette analyse a montré que la **sensibilité moyenne des souches au fluxapyroxad peut-être différente sur deux sites espacés de moins de 100 km**. Les données du « Réseau d'essais en fongicides » ont montré, sur plusieurs années, que la pression parasitaire était en moyenne plus élevée à Ath. Une utilisation plus importante des fongicides dans cette région pourrait expliquer la sensibilité moyenne au fluxapyroxad plus élevée à Ath qu'à Thy-le-Château.

La sensibilité de la population baseline de 2008 et 2009 de *Z. tritici* testée au fluopyram et au fluxapyroxad, a été comparée à celle de la population baseline irlandaise issue de souches isolées durant la période 2005 à 2010 et évaluée par Dooley *et al.* (2016). Pour les deux molécules fluxapyroxad et le fluopyram, **la valeur moyenne est similaire dans les deux études** (tableau 7) et suggère que le niveau de sensibilité des populations des deux pays était semblable. Les deux études doivent être comparées avec précaution vu qu'elles ont été réalisées sur un nombre différents de parcelles d'essais, d'échantillons et de période d'isolement. Il aurait été judicieux de tester plusieurs souches dont les valeurs d'EC50 sont connues en Irlande pour standardiser et comparer le niveau de sensibilité entre les deux pays.

Tableau 7: Comparaison de la sensibilité (EC50 en mg/L) des souches la baseline de *Z. tritici* en Belgique (2008-2009) par rapport aux souches de la baseline (2005 à 2010) en Irlande et Royaume-Uni (Dooley et al., 2016) par matière active.

Auteur	Matière active	Gamme de valeurs	Moyenne	Médiane
Nysten*	Fluxapyroxad	0,021 - 0,751	0,189	0,166
Nysten*	Fluopyram	0,021-19,151	1,572	0,632
Dooley**	Fluxapyroxad	0,022 à 0,668	0,188	0,149
Dooley**	Fluopyram	0,076 à 10,95	1,12	0,588
*la baseline est basée sur une collection de 63 souches des années 2008 et 2009 isolées de champs non traités en Wallonie (à Ath et Thy-le-Château).				
**la baseline est basée sur une collection de 209 souches isolées des années 2005 à 2010 dans 21 parcelles en Irlande et au Royaume-Uni.				

Ensuite, la sensibilité moyenne de la population belge de souches isolées en 2016 et 2017 de *Z. tritici* a été comparée à celle de huit souches irlandaises issues de la collection de souches de 2015 et évaluée par Dooley *et al.* (2015). Pour les deux molécules, le fluxapyroxad et le fluopyram, la valeur moyenne est bien supérieure (tableau 8) et **suggère une résistance plus élevée en Irlande**. De nouveau, les deux études doivent être comparées avec précaution car elles ont été réalisées sur un nombre d'échantillons dix fois moins grand en Irlande et que la population irlandaise comprend les deux souches qui admettent la mutation C-H152R qui leur confère une haute résistance aux molécules SDHI et donc une valeur très élevée d'EC50. Leur étude s'était portée principalement sur l'évaluation de la sensibilité au penthiopyrad.

Tableau 8: Comparaison de la sensibilité moyenne au fluxapyroxad (EC50 en mg/L) entre les populations actuelles (2016-2017) des souches de *Z. tritici* isolées en Belgique et en Irlande (Dooley et al., 2016).

Auteur	Matière active	Moyenne
Nysten (N=122)	Fluxapyroxad	0,54
Nysten (N=122)	Fluopyram	3,94
Dooley (N=8)	Fluxapyroxad	25,71
Dooley (N=8)	Fluopyram	6,21

Les comparaisons de la population baseline ainsi que de celle actuelle (2015 pour l'Irlande et 2016-2017 pour la Belgique) suggèrent que l'évolution du niveau de résistance a été plus rapide dans la population irlandaise que dans la population belge. Le programme fongicide recommandé en Irlande comprend quatre passages de fongicides lors d'une forte pression parasitaire (vulgarisation des recherches de Kildea par Gillian Dufficy, 2017). Des produits à base de molécules SDHI sont conseillés lors du deuxième et du troisième passage en mélange avec d'autres familles (triazoles

et multi-sites). Cette forte pression fongicide pourrait être responsable de cette évolution des résistances plus rapide en Irlande qu'en Belgique où il est recommandé de n'utiliser qu'un produit par saison à base de molécules SDHI lors du programme qui contient généralement deux traitements fongicides. Une analyse avec des données d'autres pays (France, Royaume-Uni,...) permettraient de comparer la vitesse d'évolution des populations de septoriose à travers l'Europe.

Les tests ont été réalisés sur deux molécules fongicides mais des tests sur les autres matières actives de la famille des SDHI comme le boscalid, le bixafen ou encore le benzovindiflupyr pourraient être réalisés. Bien que le fluopyram soit peu présent dans les produits commerciaux belges, il a été testé afin de connaître le comportement de *Z. tritici* face à une matière active d'un autre groupe chimique. Le comportement face au fluopyram a déjà été mentionné comme différent des autres molécules SDHI. Par exemple, les souches d'Irlande admettant les mutations C-H152R et D-R47W dans le gène SDH ont été démontrées comme moins sensibles aux molécules SDHI à l'exception du fluopyram (Dooley et *al.*, 2016). De plus, une résistance croisée incomplète du fluopyram par rapport aux autres molécules a déjà été rapportée (Dooley et *al.*, 2016).

En moyenne, des dosages plus élevés en fluopyram ont été requis pour atteindre les EC50 des souches comparativement aux doses en fluxapyroxad. En Belgique, un seul produit contenant du fluopyram est agréé en céréales (ASCRA PRO, voir détails sur www.fytoweb.be). Le fluopyram est donc plus rarement utilisé dans les programmes fongicides. Le test de résistance croisée signale qu'il y a une légère corrélation entre les deux matières actives et confirme l'idée que les matières actives font partie de la même famille mais sont de groupes chimiques différents. Cette observation suggère que les programmes fongicides comprenant le fluxapyroxad peuvent également sélectionner de la résistance et modifier la sensibilité moyenne des souches au fluopyram. Le fluxapyroxad est d'ailleurs la matière active retrouvée dans le produit Adexar utilisé dans les trois programmes fongicides de nos essais et les souches ont déjà été soumises à la pression fongicide de cette matière active. Des tests supplémentaires avec les autres matières actives de la famille des SDHI donneraient l'occasion d'affiner les résultats de résistance croisée. Cela permettrait de mieux comprendre le comportement de *Z. tritici* face à l'ensemble de la famille des carboxamides et d'observer si des phénomènes de résistances croisées ou multiples (MDR) sont présents dans la population de souches belges.

IV.2. INFLUENCE DES PROGRAMMES FONGICIDES

Aujourd'hui, l'Europe, par le biais des stratégies IPM, veut réduire l'utilisation des produits de protection des plantes comme les fongicides. Toutefois, les dégâts engendrés chaque année par la septoriose sur les cultures de blé ne permettent pas, pour le moment, d'exclure l'utilisation de fongicides dans les programmes de protection. L'effet de la diminution de la dose agréée/conseillée d'un produit SDHI dans un programme fongicide a été évalué à la fois sur le rendement brut et net mais aussi sur la sélection de la résistance aux SDHI de la septoriose.

La plupart des firmes de fongicides recommandent d'utiliser la pleine dose agréée pour éviter l'émergence des résistances. La pleine dose permettrait ainsi de réduire la population et par la même occasion le nombre de mutations. Toutefois, dans le processus d'homologation d'un produit, aucun test sur la sélection des résistances n'est prévu et la dose homologuée représente uniquement la dose efficace sur la maladie. Dans le cadre de la lutte contre la septoriose, il est difficile d'éliminer lors d'une pulvérisation de fongicide tous les individus car ces derniers se retrouvent sur différents étages de la canopée et même dans l'atmosphère. Il restera donc des individus qui ne recevront pas ou très peu de fongicide, peu importe la dose pulvérisée en champs. Van den Bosch *et al.* (2011) ont passé en revue différentes études se penchant sur l'effet de modulation de la dose sur le risque de résistance face aux fongicides et la majorité d'entre-elles montrent qu'une dose de fongicide élevée exerce une sélection vers un niveau de résistance plus élevée. Mavroeidi et Shaw (2006) ont montré que la sélection de la résistance dans le cas d'une triazole augmentait de manière proportionnelle avec la dose. Gutierrez-Alonso *et al.* (2017) ont également montré dans leur étude, in vitro avec des répliquas de la souche de référence IPO323, que la sélection des résistances était positivement liée à la dose en fongicides. Les résultats de l'étude de Dooley *et al.* (2016) avaient quant à eux affirmé que la réduction de dose en SDHI n'avait pas d'effet sur la sensibilité des souches. Notre étude montre que la **réduction de la dose** du produit contenant des molécules SDHI en deuxième partie d'un programme fongicide **diminue même la sensibilité des souches** car les tests au fluxapyroxad et au fluopyram ont prouvé qu'aucune différence significative n'était observée entre la sensibilité moyenne des souches de parcelles non-traitées et celle des souches du programme comprenant une demi-dose en SDHI lors du second traitement. Le programme qui comprenait deux traitements -dont le second traitement comprend une pleine dose en produit SDHI- sélectionne quant à lui des souches plus résistantes. Il semblerait que la **manipulation de la dose soit donc une tactique supplémentaire** à celle des mélanges avec des molécules de la famille des triazoles pour limiter l'émergence des résistances.

Le bénéfice des traitements fongicides sur les rendements en blé est incontestable. L'analyse des résultats du « Réseau d'essais fongicides » confirme que toutes les parcelles suivant des programmes fongicides obtiennent des meilleurs rendements bruts et nets que celles non-traitées. Les stratégies de protection doivent cependant être adaptées à la parcelle et à l'année. Mahieu *et al.* avait exposé, dans l'édition 2013 du Livre Blanc des Céréales, des comparaisons de rendements nets en fonction du prix du blé. Il avait pu montrer qu'en fonction de la pression parasitaire et du prix du blé, le choix de protection se tournait vers un ou deux passages en fongicides. En 2011 à Ath par exemple, une double protection avait été en moyenne plus rentable lorsque le prix du blé dépassait les 210€/tonne. En dessous de ce prix, c'est la protection à un seul passage qui avait montré le meilleur rendement net. Comme conseillé par Duvivier *et al.* (2018) ou par Decarrier et Gagliardi (2015), les programmes fongicides doivent donc être **ajustés selon la nuisibilité attendue et l'évolution du prix** du blé. Le prix du blé a été fixé à 150€/tonne pour 2016 et 2017 mais il a explosé pour la saison 2018 avec un prix d'environ 200€/tonne. Ce prix plus avantageux pour 2018 influencera sans doute les gains de rendements nets et donc les stratégies de protection. En 2017 à Thy-le-Château, le programme à un seul passage est le plus économiquement rentable. Ceci confirme qu'un seul traitement peut être suffisant pour protéger la culture si les conditions de la saison et de la parcelle le permettent. Quant aux programmes à deux passages, les rendements nets ne diffèrent pas selon qu'on emploie une dose pleine ou une demi-dose en produit SDHI lors du deuxième traitement ce qui affirme que **la demi-dose peut être employée sans affecter les rendements nets**.

Enfin, en Belgique, où les programmes fongicides comprennent majoritairement deux traitements par saison, une réduction de la dose du produit contenant les molécules SDHI dans le deuxième traitement du programme, permettrait de limiter la sélection de souches résistantes et n'occasionnerait pas spécialement de perte de rendement net. Des essais futurs devront être réalisés pour confirmer cette tendance.

IV.3. SÉQUENÇAGE ET AGRESSIVITÉ DES SOUCHES

Les résultats du séquençage du gène de la succinate déshydrogénase (sous unité C) relèvent **cinq mutations**. Ces mutations ont déjà été toutes rapportées dans la littérature par Dooley *et al.* (2016) et Yamashita et Fraaije (2018). Les mutations C-N33T et C-N34T ont été retrouvées dans des souches ayant différents niveaux de sensibilité et ne semblent pas liées à la résistance. Dooley *et al.* (2016) avaient mentionné qu'elles n'auraient pas d'impact sur le profil de résistance aux SDHI des

souches et elles avaient d'ailleurs été largement retrouvées dans les séquences des souches de leur population baseline. Quant aux mutations C-I29V et C-F23V, elles ont déjà été mentionnées dans les séquences de souches de la population baseline et admettent des résistances de niveau faible (Dooley *et al.*, 2016). La mutation C-W80S est rapportée depuis 2012 dans quelques souches isolées en champs en France et au Royaume-Uni avec une faible résistance pour les molécules SDHI (Dooley, 2015). Les mutations C-H152R ou D-R47W, admettant des profils de résistance élevée (Dooley *et al.*, 2016), n'ont pas été détectées pour le moment dans les populations belges isolées en Wallonie.

Le but de l'essai réalisé en serre était de voir si, en l'absence de pression fongicide, les souches résistantes (ayant des valeurs d'EC50 élevées) présentaient ou non une agressivité distincte des autres. En effet, des coûts de « fitness » ou de valeur adaptative accompagnent souvent la résistance à un fongicide et diminuent ainsi naturellement la fréquence d'individus résistants dans les populations en l'absence de pression de sélection (Milgroom *et al.*, 1989 ; Shaw, 1989). Les souches plus adaptées se développeraient et prendraient de la place plus rapidement en pénalisant les souches moins adaptées. Les observations graphiques ont montré que la souche irlandaise résistante OP-15-13 qui contient la mutation C-H152R dans le gène SDH (sous-unité C) n'est **pas la souche la moins agressive** et est arrivé en 16^{ième} position sur les 25 souches testées. Scalliet *et al.* (2013) ont démontré que la souche admettant cette mutation avait une diminution d'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase et pourrait ne pas se propager dans la nature dû à cette pénalité. Pourtant nos résultats permettent de mettre en doute ce constat dans le cas de conditions expérimentales. Le rapport de la FAO sur le code international de conduite pour la distribution et l'utilisation des pesticides mentionne la notion des « gènes modificateurs ». La faible valeur adaptative de certaines souches pourrait être surmontée au fil des années grâce à des gènes auxiliaires ou modificateurs. Il existe toutefois peu d'études concernant ce mécanisme chez les champignons.

Parmi les 25 souches testées, il a été constaté que celles admettant la mutation C-N33T et C-N34T se positionnent sur toute l'échelle d'agressivité (en position 1, 2, 4, 5, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 20, 21 et 22^{ième} place sur les 25 souches testées) et suggère qu'il n'y a pas de lien entre ces deux mutations et l'agressivité des souches. Les deux souches admettant la mutation C-I29V se situent en 10 et 24^{ième} position du classement d'agressivité et il est de nouveau difficile d'affirmer un lien entre les deux facteurs. La souche admettant les mutations C-I29V et C-F23S s'est positionnée entre les deux précédentes, à la 19^{ième} place, et ne nous confirme pas qu'une ou les deux mutations sont liées à des pénalités dans les mécanismes d'agressivité des souches. Le profil de la souche avec la mutation C-W80S n'a malheureusement pas pu être testé. Des études supplémentaires sont encore nécessaires dans ce domaine.

Des ajustements techniques s'imposent pour un renouvellement futur de l'expérience. La manipulation des plantules a été délicate et les tiges ont facilement versées ou cassées. Il semble judicieux de travailler sur des plantes adultes afin éviter que les feuilles inoculées entrent en sénescence avant que les observations ne soient faites. Toutefois, il est difficile d'obtenir des plantes adultes en serres. Un substrat composé de 50% de terreau et de sable a été utilisé pour un bon drainage. La proportion de sable semble trop importante car elle a entraîné un moins bon maintien des plantules dans les pots. L'inoculation est une étape importante et délicate pour l'agent pathogène *Z. tritici*. Des tests de concentrations de conidies avaient été préalablement effectués mais il serait judicieux de réévaluer la concentration à employer pour garantir l'infection sur chaque feuille. Les conditions de la serre étaient bien régulées en température et taux d'humidité relative. Toutefois, la serre étant fortement exposée au sud, la ventilation a été vigoureuse durant toute la période d'essai afin de garantir les 20°C dans la serre. Cette ventilation a semble-t-il influencé la verse et le dessèchement des feuilles de certaines plantules entraînant des dégâts et un nombre d'échantillons moindre pour certaines souches. Une étape d'analyse par imagerie normalement prévue n'a pas pu être réalisée dû à la sénescence de la presque totalité des feuilles inoculées. Celle-ci semble intéressante à mettre en place pour calculer la surface infectée de manière automatique et précise. La technique de la zone marquée de 5 cm semble être une méthode d'évaluation intéressante. L'utilisation d'une solution de Tween20 plus diluée éviterait les jaunissements provoqués par cet agent solubilisant et qui ont été notés au début des observations. La disposition identique des plantules dans tous les pots de façon à les évaluer uniformément au fil des dates d'observations et l'emplacement aléatoire des pots sur les trois tables permettent de fournir des données valables et constantes.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de la mise en place de stratégies de protection est d'atteindre un optimum économique et de protéger la culture de blé dans les semaines cruciales de remplissage des grains. Étant donné l'incidence de la septoriose en Belgique, des stratégies intégrant des programmes fongicides sont essentielles pour maintenir des rendements élevés. Le potentiel reproductif de *Z. tritici*, associant des cycles de reproduction asexuée et sexuée tout au long de la saison, entraîne un nombre élevé de descendants par organisme et le nombre de souches mutantes qui sont résistantes peut par la même occasion augmenter rapidement. La pression exercée par l'utilisation des fongicides dans nos champs entraîne une sélection de ces souches mutantes et favorise leur développement. Cela met en péril la durabilité et l'efficacité des fongicides en champs dans un contexte où de moins en moins de molécules actives sont disponibles.

La question de recherche à laquelle ce travail a tenté de répondre est de savoir si certains programmes fongicides sélectionnent moins de souches plus résistantes aux SDHI en particulier et garantissent leur durée d'efficacité. Les molécules de la famille des SDHI font partie des fongicides uni-sites et présentent des risques d'émergence de résistances étant donné leur mode d'action ciblé sur un seul site enzymatique du pathogène (la succinate déshydrogénase).

L'évolution du niveau de résistance aux SDHI s'est confirmée dans notre étude avec un niveau de sensibilité moyen plus élevé dans les populations actuelles (2016-2017) que dans celles isolées il y a presque dix ans (2008-2009). L'étude de l'influence de programmes fongicides a également montré des résultats intéressants. L'emploi d'une demi-dose de produit contenant un fongicide SDHI (produit commercial Adexar) en deuxième partie d'un programme fongicide sélectionnerait moins de résistance que l'utilisation de la pleine dose. Avec ce programme à dose réduite, la pression de sélection est similaire à celle mesurée dans les parcelles non traitées. La réduction de la dose paraît donc être un outil supplémentaire pour minimiser le risque de développement de résistance aux fongicides SDHI. Il est donc à mettre en parallèle avec le principe de mélanges de molécules à modes d'actions différents. Les résultats des expériences ont soulevé la question de savoir si la dispersion des souches résistantes était bien inversement proportionnelle à la sévérité de l'année ou au contraire proportionnelle. Cette étude a soutenu la première idée mais les observations ne portant que sur deux années consécutives, il est difficile de certifier ce constat. Des études supplémentaires avec un nombre d'échantillons plus conséquent permettront peut-être de l'affirmer. Il est alors conseillé d'ajuster son

programme fongicide en fonction de la nuisibilité de l'année et du prix du blé dans les stratégies IPM.

La surveillance et l'étude de l'évolution des résistances sera d'autant plus proche de la réalité si elle se réalise annuellement sur des populations importantes de souches et représentatives de la zone à étudier. Des projets européens comme EURORES (<http://eurowheat.au.dk/research-projects/euro-res/>) avec les partenaires du Coordinated Integrated Pest Management (C-IPM) permettront d'élargir l'étude sur plusieurs pays d'Europe. Bien que nos résultats suivent la même tendance que les études en Irlande, il est difficile de l'affirmer vu les conditions expérimentales légèrement différentes. Des études supplémentaires mieux ajustées en serres ou dans des conditions de terrain permettront de comparer les souches entre elles et d'affirmer que les souches résistantes n'ont pas toujours une agressivité moindre ou des pénalités de valeur sélective. Un mémoire connexe réalisé par Lucas YZERBYT sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici* aux DMI est en cours et il sera également utile aux encadrants de ces mémoires de réaliser des analyses pour évaluer si des relations sont observées entre ces deux familles chimiques.

Les points clefs à retenir :

- ◆ La résistance moyenne aux SDHI des populations belges de *Z. tritici* augmente rapidement.
- ◆ Des mutations décrites au niveau de SDH-C conférant des niveaux de résistances faibles ont été détectées en Belgique.
- ◆ La diminution de la dose de fongicides SDHI appliquée permettrait de minimiser la sélection des résistances et n'occasionnerait pas spécialement de perte de rendement net.
- ◆ Les programmes fongicides doivent être ajustés à la nuisibilité et prix du blé de l'année dans nos stratégies IPM.

La surveillance du niveau de sensibilité des souches dans nos populations pathogènes belges et au niveau européen semble un **outil clef** pour prévenir et mieux comprendre les mécanismes de résistance et choisir des stratégies de contrôle IPM fiables et durables. La nécessité de rester vigilant face à l'évolution des pathogènes induit la récolte de données de terrain en temps réel. Ceci est la clef pour ne pas se faire distancer par ces organismes vivants en continuelle évolution. C'est tout le secteur de l'agronomie qui est tributaire de ce monde vivant complexe et plus résilient chaque jour.

*« La vie est un mouvement : plus il y a de vie, plus il y a de flexibilité. »
Albert Einstein*

The end.

RÉFÉRENCES

- [Ackrell, 2000] Ackrell, B. A. (2000). Progress in understanding structure–function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS letters*, 466(1), 1-5.
- [Avenot et al., 2010] Avenot, Hervé F, and Themis J Michailides. "Progress In Understanding Molecular Mechanisms and Evolution of Resistance to Succinate Dehydrogenase Inhibiting (sdhi) Fungicides In Phytopathogenic Fungi." *Crop protection* 29.7 (2010): 643-651. doi: 10.1016/j.cropro.2010.02.019
- [Avila-Adame et Köller, 2003] Avila-Adame, C., & Köller, W. (2003). Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current genetics*, 42(6), 332-338.
- [Baccar et al., 2011] Baccar, Rim, Christian Fournier, Tino Dornbusch, Bruno Andrieu, David Gouache, et Corinne Robert. 2011. « Modelling the Effect of Wheat Canopy Architecture as Affected by Sowing Density on Septoria Tritici Epidemics Using a Coupled Epidemic–Virtual Plant Model ». *Annals of Botany* 108 (6): 1179-94. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr126>.
- [Bankina et al., 2015] Bankina, B., RUŽA, A., PAURA, L., & Priekule, I. (2015). The effects of soil tillage and crop rotation on the development of winter wheat leaf diseases. *Zemdirbyste-Agriculture*, 102(1).
- [Bayles, 1991] Bayles, R. A. (1991) *Plant Var. Seeds* 4, 177–183.
- [Bernard et al., 2013] Bernard, F., Sache, I., Suffert, F., & Chelle, M. (2013). The development of a foliar fungal pathogen does react to leaf temperature!. *New Phytologist*, 198(1), 232-240.
- [Bockus et al., 2010] WW Bockus, RL Bowden, RM Hunger, WL Morrill, TD Murray et RW Smiley. 2010. *Compendium des maladies du blé*, troisième édition. Société américaine de phytopathologie, St. Paul, MN.
- [Bocquet et al., 2018] Bocquet, Laetitia, Céline Rivière, Charles Dermont, Jennifer Samaillie, Jean-Louis Hilbert, Patrice Halama, Ali Siah, et Sevser Sahpaz. 2018. « Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* ». *Industrial Crops and Products* 122 (octobre): 290-97. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>.
- [Bonjean et Leblond, 2000] Bonjean A., Leblond R., 2000. *Les Trésors du blé*. Les Presses du Management, Paris, 120 p
- [Bonjean, 2001] « Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*Triticum aestivum* L.)

[Brent et Hollomon, 2007] Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk (pp. 1-48). Brussels: Global Crop Protection Federation.

[Brent, 1995] Brent, Keith J. 1995. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed? FRAC Monograph, no. 1. Brussels: GIFAP.

[Brown et al., 2015] Brown, James K.M., Laëtitia Chartrain, Pauline Lasserre-Zuber, et Cyrille Saintenac. 2015. « Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding ». *Fungal Genetics and Biology* 79 (juin): 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.017>.

[Brown et Rant, 2013] Brown, J. K. M., et J. C. Rant. 2013. « Fitness Costs and Trade-Offs of Disease Resistance and Their Consequences for Breeding Arable Crops ». *Plant Pathology* 62 (décembre): 83-95. <https://doi.org/10.1111/ppa.12163>.

[Chen et al., 2017] Chen, Fengping, Guo-Hua Duan, Dong-Liang Li, et Jiasui Zhan. 2017. « Host Resistance and Temperature-Dependent Evolution of Aggressiveness in the Plant Pathogen *Zymoseptoria tritici* ». *Frontiers in Microbiology* 8 (juin). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01217>.

[Cheval et al., 2017] Cheval, Pénélope, Ali Siah, Myriam Bomble, Azul D. Popper, Philippe Reignault, et Patrice Halama. 2017. « Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France ». *Crop Protection* 92 (février): 131-33. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.017>.

[Clark et al., 2006] CLARK, W. S. *Septoria tritici* and azole performance. *Aspects of Applied Biology*, 2006, vol. 78, p. 127.

[Clark, 2006] Clark, W. S. (2006). *Septoria tritici* and azole performance. *Aspects of Applied Biology*, 78, 127.

[Cohen et Eyal, 1993] Cohen L., Eyal Z. The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathol.*1993;42:737–743.

[Cools et al., 2012] Cools, Hans J., Carlos Bayon, Sarah Atkins, John A. Lucas, et Bart A. Fraaije. 2012. « Overexpression of the Sterol 14 α -Demethylase Gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella Graminicola* Isolates Confers a Novel Azole Fungicide Sensitivity Phenotype ». *Pest Management Science* 68 (7): 1034-40. <https://doi.org/10.1002/ps.3263>.

[Cools et al., 2013] Cools, H. J., N. J. Hawkins, et B. A. Fraaije. s. d. « Constraints on the Evolution of Azole Resistance in Plant Pathogenic Fungi ». *Plant Pathology* 62 (S1): 36-42. <https://doi.org/10.1111/ppa.12128>.

[Cowger et al., 2000] Cowger, C., Hoffer, M., & Mundt, C.C. (2000). Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology*, 49, 445-451.

[Cummins et al., 2013] Cummins I, Wortley DJ, Sabbadin F, He ZS, Coxon CR, Straker HE, Sellars JD, Knight K, Edwards L, Hughes D et al (2013) Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:5812–5817

[Decarrier et Gagliardi, 2015] Decarrier, A., & Gagliardi, E. (2015). Stratégies régionales fongicides. Normandie, Picardie, Nord-Pas-de-Calais, Champagne-Ardenne. Contre les résistances à la septoriose. *Perspectives agricoles*, (418), 17.

[Delcour et al., 2014] Delcour, A., F. Van Stappen, S. Gheysens, V. Decruyenaere, D. Stilmant, P. Burny, F. Rabier, H. Louppe, et J. P. Goffart. 2014. « Etat des lieux des flux céréaliers en Wallonie selon différentes filières d'utilisation ». *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 18 (2): 181-92.

[Delp et Dekker, 1985] Delp, C. J., & Dekker, J. (1985). Fungicide resistance: definitions and use of terms. *EPPO Bulletin*, 15(3), 333-335.

[Dooley et al., 2016a] Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J., Kildea, S., 2016a. Detection of *Zymoseptoria tritici*.SDHI-insensitive field isolates carrying the SdhC-H152R and SdhD-R47W substitutions. *Pest. Manag. Sci.* 72, 2203–2207. doi:10.1002/ps.4269

[Dooley et al., 2016b] Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J., Kildea, S., 2016b. The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zymoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity. *Pest. Manag. Sci.* 72, 1150–1159. doi:10.1002/ps.4093

[Dooley, 2015] Dooley, H. (2015). Fungicide-resistance management tactics: impacts on *Zymoseptoria tritici* populations (Doctoral dissertation, University of Reading).

[Duncan et Howard, 2000] DUNCAN, K., & HOWARD, R. (2000). Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research*, 104(9), 1074-1082.

[Duvivier et al., 2013] Duvivier, M., Dedeurwaerder, G., De Proft, M. et al. *Eur J Plant Pathol* (2013) 137: 325. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0245-0>

[Duvivier et al., 2018] Duvivier, M., Heens, B., Mahieu, O., Meza, R., Monfort, B., Bodson, B., & De Proft M. (2013). Lutte intégrée contre les maladies. In B. Bodson & M. De Proft (Ed.), *Le livre Blanc Céréales-Gembloux*, section 6. Gembloux.

[Duvivier, 2015] Duvivier, Maxime. Distribution of the airborne inoculum of wheat leaf rust and septoria tritici blotch : impact on epidemics in wheat fields and implications for integrated pest management. Prom. : De Proft, Michel ; Legrève, Anne

[Eyal et al., 1987] Eyal Z., Scharen A.L., Prescott J.M., Van Ginkel M. CIMMYT; Mexico, D.F.: 1987. The Septoria Diseases of Wheat, Concepts and Methods of Disease Management.

[Figuerola et al., 2018] Figuerola, Melania, Kim E. Hammond-Kosack, et Peter S. Solomon. 2018. « A Review of Wheat Diseases-a Field Perspective ». Molecular Plant Pathology 19 (6): 1523-36. <https://doi.org/10.1111/mpp.12618>.

[Fisher et al., 2012] Fisher, A., Coleman, C., Hoffmann, C., Fritz, B., & Rangel, J. (2017). The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: Apidae) forager survival. Journal of economic entomology, 110(3), 802-808.

[Fleitas et al., 2017] Fleitas, M. C., Castro, A. C., & Simón, M. R. (2017). Quality and yield response to the control of *Mycosphaerella graminicola* in wheat as affected by nitrogen rate and cultivar bread-making characteristics. Crop and Pasture Science, 68(4), 317-327.

[Fones et Gurr, 2015] Fones, Helen, et Sarah Gurr. 2015. « The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat : An EU perspective ». Fungal Genetics and Biology 79 (juin): 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>.

[Fraaije et al., 2005] Fraaije, B. A., Cools, H. J., Fountaine, J., Lovell, D. J., Motteram, J., West, J. S., et al. (2005). Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology, 95, 933-941.

[Fraaije et al., 2005a] Fraaije, B. A., Cools, H. J., Fountaine, J., Lovell, D. J., Motteram, J., West, J. S., & Lucas, J. A. (2005). Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology, 95(8), 933-941.

[Fraaije et al., 2007] Fraaije, B. A., Cools, H. J., Kim, S. H., Motteram, J., Clark, W. S., & Lucas, J. A. (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. Molecular Plant Pathology, 8(3), 245-254.

[Fraaije et al., 2012] Fraaije, B.A., Bayon, C., Atkins, S., Cools, H.J., Lucas, J.A., Fraaije, M.W., 2012. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. Molecular Plant Pathology 13, 263–275. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00746.x

[Ghini et al., 2008] Ghini, R., Hamada, E., & Bettiol, W. (2008). Climate change and plant diseases. *Scientia Agricola*, 65(SPE), 98-107.

[Gisi et al., 2002] Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A, 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58, 859–67.

[Goodwin et al., 2011] Goodwin, Stephen B., Sarrah Ben M'Barek, Braham Dhillon, Alexander H. J. Wittenberg, Charles F. Crane, James K. Hane, Andrew J. Foster, et al. 2011. « Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella Graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis ». *PLOS Genetics* 7 (6): e1002070. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002070>.

[Gutiérrez-Alonso et al., 2017] Gutiérrez-Alonso, Omar, Nichola J. Hawkins, Hans J. Cools, Michael W. Shaw, et Bart A. Fraaije. 2017. « Dose-dependent selection drives lineage replacement during the experimental evolution of SDHI fungicide resistance in *Zymoseptoria tritici* ». *Evolutionary Applications* 10 (10): 1055-66. <https://doi.org/10.1111/eva.12511>.

[Hägerhäll, 1997] Hägerhäll, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases: variations on a conserved theme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1320(2), 107-141.

[Harlan et Zohary, 1966] Harlan, J. R., and Zohary, D. (1966). Distribution of wild wheats and barley. *Science*. 153: 1074-1080.

[Heun et al., 1997] Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting

[Hieck et Jørgensen, 2016] Heick, Thies, et Lise Jørgensen. 2016. Fungicide Spray Strategies Avoiding Resistance Development in Winter Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*.

[Hillocks et Cooper, 2012] Hillocks, Rory J., et Jerry E. Cooper. 2012. « Integrated Pest Management – Can It Contribute to Sustainable Food Production in Europe with Less Reliance on Conventional Pesticides? » *Outlook on Agriculture* 41 (4): 237-42. <https://doi.org/10.5367/oa.2012.0107>.

[Hobbelen et al., 2013] Hobbelen, P. H. F., Paveley, N. D., Oliver, R. P., & Van den Bosch, F. (2013). The usefulness of fungicide mixtures and alternation for delaying the selection for resistance in populations of *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat: A modeling analysis. *Phytopathology*, 103(7), 690-707.

[Jensen et Jørgensen, 2016] Jensen, P. K., & Jørgensen, L. N. (2016). Interactions between crop biomass and development of foliar diseases in winter wheat and the potential to graduate the fungicide dose according to crop biomass. *Crop Protection*, 81, 92-98.

[Juroszek et von Tiedemann, 2011] Juroszek, P., et A. von Tiedemann. 2011. « Potential Strategies and Future Requirements for Plant Disease Management under a Changing Climate ». *Plant Pathology* 60 (1): 100-112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02410.x>.

[Kema et al., 1996c] Kema, G. H., Yu, D., Rijkenberg, F. H., Shaw, M. W., & Baayen, R. P. (1996). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology*, 86(7), 777-786.

[Kema et al., 1997] Kema GHJ, vanSilfhout CH (1997) Genetic variation for virulence and resistance in the wheat *Mycosphaerella graminicola* pathosystem. 3. Comparative seedling and adult plant experiments. *Phytopathology* 87:266–272

[Kirikyali et al., 2015] Azole and SDHI Sensitivity Status of *Zymoseptoria tritici* Field Populations Sampled in France, Germany and the UK during 2015. In: Deising HB; Fraaije B; Mehl A; Oerke EC; Sierotzki H; Stammler G (Eds), "Modern Fungicides and Antifungal Compounds", Vol. VIII, pp. 153-158. © 2017. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, ISBN: 978 3 941261 15 0

[Kretschmer et al., 2009] Kretschmer, M., Leroch, M., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., ... & Hahn, M. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 5(12), e1000696.

[Kuck et Russel, 2006] Kuck, K., & Russell, P. E. (2006). FRAC: Combined resistance risk assessment. *Aspects of Applied Biology*, 78, 3.

[Leroux et al., 2007] Leroux, Pierre, Catherine Albertini, Angélique Gautier, Michel Gredt, et Anne-Sophie Walker. 2007. « Mutations in the CYP51 Gene Correlated with Changes in Sensitivity to Sterol 14 Alpha-Demethylation Inhibitors in Field Isolates of *Mycosphaerella Graminicola* ». *Pest Management Science* 63 (7): 688-98. <https://doi.org/10.1002/ps.1390>.

[Leroux et al., 2010] Leroux, Pierre, Michel Gredt, Michaela Leroch, et Anne-Sophie Walker. 2010. « Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (19): 6615-30. <https://doi.org/10.1128/AEM.00931-10>.

[Leroux et Walker, 2011] Leroux, P., Walker, A.-S., 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest. Manag. Sci.* 67, 44–59. doi:10.1002/ps.2028

[Linde et al., 2002] Long-term benefits of biventricular pacing in congestive heart failure: results from the MUltisite STimulation in cardiomyopathy (MUSTIC) study Cecilia Linde, Christophe Leclercq, Steve Rex, Stephane Garrigue, ThomasLaverigne, Serge Cazeau,

William McKenna, Melissa Fitzgerald, Jean-Claude Deharo, Christine Alonso, Stuart Walker, Frieder Braunschweig, Christophe Bailleul, Jean-Claude Daubert, on behalf of the Multisite STimulation In Cardiomyopathies (MUSTIC) Study Group

[Lindhout, 2002] Lindhout, P., (2002). The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, 124, 217-226.

[Lovell et al., 1997] Lovell, D. J., S. R. Parker, T. Hunter, D. J. Royle, et R. R. Coker. 1997. « Influence of Crop Growth and Structure on the Risk of Epidemics by *Mycosphaerella Graminicola* (*Septoria Tritici*) in Winter Wheat ». *Plant Pathology* 46 (1): 126-38. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1997.d01-206.x>.

[Lovell et al., 2004a] Lovell, D. J., Hunter, T., Powers, S. J., Parker, S. R., & Van den Bosch, F. (2004a). Effect of temperature on latent period of *Septoria* leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology*, 53, 170–181.

[Lucas et al., 2015] Lucas, J.A., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A., 2015. Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance, in: Sariaslani, S., Gadd, G.M. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 29–92. doi:10.1016/bs.aambs.2014.09.001

[Marcel et al., 2017] Marcel, Thierry, Aurélie Ducasse, Jérôme Compain, Nicolas Lapalu, Z Chang Zhong Chen, Fanny E. Hartmann, Johann Confais, et al. 2017. « A first glimpse into the genetic architecture of pathogenicity of *Zymoseptoria tritici* on bread wheat ». In 29. Fungal genetics conference Asilomar 17, p.246. Pacific Grove, CA, United States. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01530825>.

[Mavroeidi et Shaw, 2006] Mavroeidi V. I., et Shaw M. W. 2006. « Effects of fungicide dose and mixtures on selection for triazole resistance in *Mycosphaerella graminicola* under field conditions ». *Plant Pathology* 55 (6): 715-25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01441.x>.

[McCartney et al., 2007] McCartney, C., P. C. Mercer, L. R. Cooke, et B. A. Fraaije. 2007. « Effects of a strobilurin-based spray programme on disease control, green leaf area, yield and development of fungicide-resistance in *Mycosphaerella graminicola* in Northern Ireland ». *Crop Protection* 26 (8): 1272-80. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.10.027>.

[McDonald et Martinez 1990] McDonald BA, Martinez JP (1990) Restriction fragment length polymorphisms in *Septoria tritici* occur at a high frequency. *Curr Genet* 17:133–138. <https://doi.org/10.1007/BF00312858>

[McKay et al., 2011] McKay, A H, G C Hagerty, G B Follas, M S Moore, M S Christie, et R M Beresford. s. d. « Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Fungicide Resistance Prevention Strategy » *New Zealand Plant Protection* 64: 119-124 (2011)

[Mikaberidze et al., 2014] Mikaberidze, Alexey, Bruce A. McDonald, et Sebastian Bonhoeffer. 2014. « Can High-Risk Fungicides Be Used in Mixtures Without Selecting for Fungicide Resistance? » *Phytopathology* 104 (4): 324-31. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-13-0204-R>.

[Mikaberidze et al., 2015] Mikaberidze, Alexey, et Bruce A. McDonald. 2015. « Fitness Cost of Resistance: Impact on Management ». In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*, 77-89. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_6.

[Milgroom et al., 1997] Milgroom, M. G., & Fry, W. E. (1997). Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 24, pp. 1-30). Academic Press.

[Morais, 2015] Morais, David. 2015. « Components of the early stages of septoria tritici blotch epidemics (*Zymoseptoria tritici*): quantity, efficiency and origin of primary inoculum ». Theses, AgroParisTech. <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-01142864>.

[Moreau et Maraite, 2000] Moreau, J.-M., et H. Maraite. 2000. « Development of an Interactive Decision-Support System on a Web Site for Control of *Mycosphaerella Graminicola* in Winter Wheat* ». *EPPO Bulletin* 30 (1): 161-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2000.tb00871.x>.

[Mundt et al., 2009] Mundt, C. (2009). Importance of autoinfection to the epidemiology of polycyclic foliar disease. *Phytopathology*, 99, 1116-1120.

[Noble et al., 1966] NOBLE, M., MACGARVIE, Q.D., HAMS, A. F. & LEAFE, E. L. (1966). Resistance to mercury of *Pyrenophora avenae* in Scottish seed oats. *Plant Pathology* '15, 23-28

[Omrane et al., 2017] Omrane, S., Audéon, C., Ignace, A., Duplaix, C., Aouini, L., Kema, G., ... & Fillinger, S. (2017). Plasticity of the MFS1 Promoter Leads to Multidrug Resistance in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere*, 2(5), e00393-17.

[Omura et Shiomi, 2007] Ōmura, S., & Shiomi, K. (2007). Discovery, chemistry, and chemical biology of microbial products. *Pure and Applied Chemistry*, 79(4), 581-591.

[Ors et al., 2014] Ors, Marie-Eva, Gille Couleaud, Claude Maumene, Ali Siah, Béatrice Randoux, Fabienne Boizet, Céline Ade, et al. 2014. “Cultivar and dose dependent efficacy of wheat resistance inducers against *Septoria tritici* blotch in laboratory and field conditions.”

[Orton et al., 2011] Orton, E. S., Deller, S., & Brown, J. K. (2011). *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control. *Molecular plant pathology*, 12(5), 413-424.

[Palmer et Skinner, 2002] Palmer, Claire-Louise, et Wendy Skinner. 2002. « *Mycosphaerella Graminicola*: Latent Infection, Crop Devastation and Genomics ». *Molecular Plant Pathology* 3 (2): 63-70. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2002.00100.x>.

[Pielaat et al., 2002] Pielaat, A., Van den Bosch, F., Fitt, B. D., & Jeger, M. J. (2002). Simulation of vertical spread of plant diseases in a crop canopy by stem extension and splash dispersal. *Ecological Modelling*, 151(2-3), 195-212.

[Rapilly, 1991] Rapilly, F. (1991). *L'épidémiologie en pathologie végétale. Mycoses aériennes*. Éditions Quae.

[Rehfus et al., 2017] Rehfus, A., D. Strobel, R. Bryson, et G. Stammler. 2017. « Mutations in Sdh Genes in Field Isolates of *Zymoseptoria Tritici* and Impact on the Sensitivity to Various Succinate Dehydrogenase Inhibitors ». *Plant Pathology* 67 (1): 175-80. <https://doi.org/10.1111/ppa.12715>.

[Robert et al., 2018] Robert, Corinne, Guillaume Garin, Mariem Abichou, Vianney Houès, Christophe Pradal, et Christian Fournier. s. d. « Plant Architecture and Foliar Senescence Impact the Race between Wheat Growth and *Zymoseptoria Tritici* Epidemics ». *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx192>.

[Roohparvar et al., 2007] Roohparvar, Ramin, Maarten A De Waard, Gert Kema, et Lute-Harm Zwiers. 2007. « MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides ». *Fungal genetics and biology: FG & B* 44 (juin): 378-88. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.09.007>.

[Rudd et al., 2015] Rudd, J. J. (2015). Previous bottlenecks and future solutions to dissecting the *Zymoseptoria tritici*-wheat host-pathogen interaction. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 24-28.

[Sánchez-Vallet et al., 2018] Sánchez-Vallet, Andrea, Simone Fouché, Isabelle Fudal, Fanny E. Hartmann, Jessica L. Soyer, Aurélien Tellier, et Daniel Croll. 2018. « The Genome Biology of Effector Gene Evolution in Filamentous Plant Pathogens ». *Annual*

[Sanderson et Hampton, 1978] F. R. Sanderson & J. G. Hampton (1978) Role of the perfect states in the epidemiology of the common Septoriadiseases of wheat, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21:2, 277-281, DOI: 10.1080/00288233.1978.10427411

[Scalliet et al., 2012] Scalliet, Gabriel, Judith Bowler, Torsten Luksch, Lucy Kirchhofer-Allan, Diana Steinhauer, Keith Ward, Michael Niklaus, et al. 2012. « Mutagenesis and Functional Studies with Succinate Dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen *Mycosphaerella Graminicola* ». *PloS One* 7 (4): e35429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035429>.

[Schiff et al., 2001] Schiff, C., Wilson, I., & Somerville, S. (2001). Polygenic powdery mildew disease resistance in *Arabidopsis thaliana*: quantitative trait analysis of the accession Warschau-1. *Plant Pathology*, 50, 690-701

[Shaw et Royle 1993] Shaw, M. W., & Royle, D. J. (1993). Factors determining the severity of epidemics of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) on winter wheat in the UK. *Plant Pathology*, 42(6), 882-899.

[Siah et al., 2010] Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P., 2010. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection* 29, 737–743.

[Siah et al., 2010a] Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P., 2010. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protect.* 29, 737–743.

[Siah et al., 2018] Siah, Ali, Myriam Bomble, Benoit Tisserant, Thierry Cadalen, Maxime Holvoet, Jean-Louis Hilbert, Patrice Halama, et Philippe Reignault. 2018. « Genetic Structure of *Zymoseptoria Tritici* in Northern France at Region, Field, Plant, and Leaf Layer Scales ». *Phytopathology*, juillet, PHYTO09170322R. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0322-R>.

[Siegel, 1981] Siegel, M., 1981. Sterol-inhibiting fungicides – effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Dis.* 65 (12), 986–989.

[Sierotzki et al., 2000] Sierotzki, H., Wullschleger, J., & Gisi, U. (2000). Point mutation in cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* field isolates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68(2), 107-112.

[Sierotzki et Scalliet, 2013] Sierotzki, H., Scalliet, G., 2013. A Review of Current Knowledge of Resistance Aspects for the Next-Generation Succinate Dehydrogenase Inhibitor Fungicides. *Phytopathology* 103, 880–887. doi:10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW

[Simón et al., 2003] Simón, M. R., Cordo, C. A., Perello, A. E., & Struik, P. C. (2003). Influence of nitrogen supply on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology*, 151(5), 283-289.

[Simón et al., 2005] Simón, M. R., Perelló, A. E., Cordo, C. A., Larrán, S., van der Putten, P. E., & Struik, P. C. (2005). Association between *Septoria tritici* blotch, plant height, and heading date in wheat. *Agronomy Journal*, 97(4), 1072-1081.

[Singh et al., 2016] Singh, R.P., Singh, P.K., Rutkoski, J., Hodson, D.P., He, X., Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., Huerta-Espino, J., 2016. Disease Impact on Wheat Yield Potential

and Prospects of Genetic Control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 303–322.
doi:10.1146/annurev-phyto-080615-095835

[Skinner et al., 1998] Skinner, W., A. Bailey, A. Renwick, J. Keon, S. Gurr, et J. Hargreaves. 1998. « A Single Amino-Acid Substitution in the Iron-Sulphur Protein Subunit of Succinate Dehydrogenase Determines Resistance to Carboxin in *Mycosphaerella Graminicola* ». *Current Genetics* 34 (5): 393-98.

[Stukenbrock et al., 2011] Stukenbrock, E. H., Bataillon, T., Dutheil, J. Y., Hansen, T. T., Li, R., Zala, M., ... & Schierup, M. H. (2011). The making of a new pathogen: insights from comparative population genomics of the domesticated wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* and its wild sister species. *Genome research*.

[Suffert et al., 2013] Suffert, F., I. Satche, et C. Lannou. 2013. « Assessment of Quantitative Traits of Aggressiveness in *Mycosphaerella Graminicola* on Adult Wheat Plants ». *Plant Pathology* 62 (6): 1330-41. <https://doi.org/10.1111/ppa.12050>.

[Suffert et Satche, 2011] Suffert, F., & Satche, I. (2011). Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology*, 60(5), 878-889.

[Sun et al., 2005] Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., ... & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7), 1043-1057.

[Sykes et al., 2018] Sykes, E. M., Sackett, K. E., Severns, P. M., & Mundt, C. C. (2018). Sensitivity variation and cross-resistance of *Zymoseptoria tritici* to azole fungicides in North America. *European Journal of Plant Pathology*, 1-6.

[Torriani et al., 2009] Torriani, S., Brunner, P., McDonald, B.A., & Sierotzki, H. (2009). QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest management*, 65, 155-162.

[Torriani et al., 2015] Torriani, S.F.F., Melichar, J.P.E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., Courbot, M., 2015. *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology, disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen Zymoseptoria tritici* 79, 8–12. doi:10.1016/j.fgb.2015.04.010

[Van den berg et al., 2016] Berg, F. van den, N. D. Paveley, et F. van den Bosch. 2016. « Dose and number of applications that maximize fungicide effective life exemplified by *Zymoseptoria tritici* on wheat – a model analysis ». *Plant Pathology* 65 (8): 1380-89. <https://doi.org/10.1111/ppa.12558>.

[Van den Bosch et al., 2011] Bosch, F. van den, N. Paveley, M. Shaw, P. Hobbelen, et R. Oliver. 2011. « The Dose Rate Debate: Does the Risk of Fungicide Resistance Increase or Decrease with Dose? » *Plant Pathology* 60 (4): 597-606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02439.x>.

[Van den Bosch et al., 2014] Bosch, Frank van den, Richard Oliver, Femke van den Berg, et Neil Paveley. 2014. « Governing Principles Can Guide Fungicide-Resistance Management Tactics ». *Annual Review of Phytopathology* 52: 175-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050158>.

[Vendite et Ghini, 1999] VENDITE, L. L., & GHINI, R. (1999). A mathematical model for fungal population growth and the fungicide resistance problem. *Journal of Biological Systems*, 7(02), 239-249.

[Vidal, 2017] Vidal, T. (2017). Intérêt de la diversité architecturale des plantes cultivées pour limiter la progression épidémique de maladies foliaires à dispersion pluviale: cas de la septoriose au sein d'associations variétales de blé.

[Yamashita et Fraaije, 2018] Yamashita, Masao, et Bart Fraaije. 2018. « Non-Target Site SDHI Resistance Is Present as Standing Genetic Variation in Field Populations of *Zymoseptoria Tritici* ». *Pest Management Science* 74 (3): 672-81. <https://doi.org/10.1002/ps.4761>.

[Yao et al., 2017] Yao, Ting-Ting, Dou-Xin Xiao, Zhong-Shan Li, Jing-Li Cheng, Shao-Wei Fang, Yong-Jun Du, Jin-Hao Zhao, Xiao-Wu Dong, et Guo-Nian Zhu. 2017. « Design, Synthesis, and Fungicidal Evaluation of Novel Pyrazole-furan and Pyrazole-pyrrole Carboxamide as Succinate Dehydrogenase Inhibitors ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (26): 5397-5403. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01251>.

[Yap et Harvay, 1971] Yap, T. C., & Harvey, B. L. (1971). Heterosis and combining ability of barley hybrids in densely and widely seeded conditions. *Canadian Journal of Plant Science*, 51(2), 115-122.

[Zadoks, 1974], J., Chang, T., & Konzak, C. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research*, 14, 415-421.

[Zhan et al., 1998] Zhan, J., Mundt, C. C., & McDonald, B. A. (1998). Measuring immigration and sexual reproduction in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*, 88, 1330-1337.

[Zhan et al., 2002] Zhan, J., Kema, G., Waalwijk, C., McDonald, B.A. (2002). Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology*, 36, 128-136.

[Zhan et McDonald, 2004] Zhan, J., & McDonald, B. A. (2004). The interaction among evolutionary forces in the pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 41(6), 590-599.

ADEXAR - Catalogue produits phytosanitaires : FDS et fiches techniques - BASF ». 2016. https://www.agro.basf.fr/agroportal/fr/fr/produits/product_details_43861.html.

Agrios, G. N. (2015). *Plant pathology*. Academic Press. London.

AHDB Cereals & Oilseeds: IS63 Fungicide activity and performance in wheat. <https://cereals.ahdb.org.uk/>

Accidents - ARVALIS-infos.fr. URL <http://www.fiches.arvalis-infos.fr>
ARVALIS : Septoriose - Maladie sur blé. Résultats 2013 [WWW Document], n.d. . Les Fiches

Blé - AgriWiki. s. d. <http://fr.agriwiki.org/index.php/Bl%C3%A9>.

Bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de céréales | Situation alimentaire mondiale | Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture [WWW Document], n.d. URL <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>

CADCO asbl site web http://www.cadcoasbl.be/p03_archives/avert2010/cadco2010-09.pdf.
https://www.cadcoasbl.be/p08_brochures/plaq3_avertissements.pdf

Domestication du blé, quand l'évolution des gènes fait bien les choses - Communiqués et dossiers de presse - CNRS. <http://www2.cnrs.fr/presse/communiquer/2351.htm>.

Fongicides céréales : privilégier les SDHI en T2 - Arvalis-infos.fr. <https://www.arvalis-infos.fr/Limiter-le-nombre-de-sdhi-par-campagne-@/view-12045-arvarticle.html>.

FRAC | Introduction et informations générales. <http://www.frac.info/working-group/sdhi-fungicides/introduction-and-general-information>

Lepoivre P., 2003. *Pythopathologie*. 1ère éd. Bruxelles : De Boeck.

Livre Blanc «Céréales» ULg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W, <http://www.livre-blanc-cereales.be/>

Mazoyer, M. and Roudart, L. (2002). *Histoire des agricultures du monde. Du néolithique à la crise contemporaine*.

Étude de l'évolution des résistances aux fongicides carboxamides dans les populations belges de *Zymoseptoria tritici*.

Présentée par Alice Nysten (année académique 2017-2018)

Résumé

Le blé est **la céréale la plus cultivée** en superficie en Wallonie. Pour l'année 2016, le SPVV renseigne une superficie de 132.085 ha emblavée avec du blé d'hiver. Chaque année en Belgique, des attaques de septoriose causée par l'agent *Zymoseptoria tritici* réduisent, de façon variable selon les conditions de l'année, les rendements en champs. Les stratégies de protection intégrant des programmes fongicides permettent de maintenir des rendements élevés. Le programme fongicide le plus couramment appliqué actuellement dans les champs wallons consiste en deux traitements sur la saison : un premier traitement au stade 2^{ème} nœud à l'aide d'un produit à base de molécules de la famille des triazoles et un second traitement au stade épiaison avec une solution commerciale comprenant un mélange de molécules triazoles et SDHI (également nommées carboxamides). Les molécules SDHI (succinate deshydrogenase inhibitor) de nouvelle génération ont été introduites sur le marché des fongicides en céréales depuis une dizaine d'années et montrent une bonne efficacité sur les maladies fongiques du blé.

Cependant, similairement au phénomène bien connu de résistances aux antibiotiques des bactéries en médecine, *Z. tritici* est capable de développer des **résistances aux fongicides** rendant les traitements moins efficaces. Le déclin de la sensibilité de ces organismes aux grandes familles de fongicides comme les strobilurines et les triazoles ainsi que la législation européenne stricte rendent les stratégies de protection moins flexibles et soulèvent de nouvelles contraintes dans la production de blé en Belgique. La surveillance des résistances émergentes et la compréhension des mécanismes sous-jacents permettent de guider nos choix de protection vers des itinéraires phytotechniques robustes et durables.

Le niveau actuel des résistances aux fongicides SDHI a été évalué en laboratoire pour les populations de septoriose isolées de deux champs wallons et de deux saisons culturales (2016 et 2017) comparativement à une population isolée en 2008 et 2009. L'influence des programmes fongicides sur la sélection des résistances et les éventuelles mutations sur la sous-unité C du gène cible SDH (succinate deshydrogenase) a également été étudiée. Un bio-essai a été réalisé en serres afin d'évaluer les traits d'agressivité des souches de septoriose ayant un profil de résistance élevée pour connaître leur comportement dans une population non soumise aux fongicides.

Les expériences ont confirmé que le **niveau moyen des résistances évoluait** depuis 2008. Cinq mutations au niveau de la séquence d'ADN de la sous-unité C du gène SDH – qui est la cible des fongicides SDH – ont pu être relevées. Des différences de sensibilité des souches issues de divers programmes fongicides ont également pu être démontrées. Cela nous a permis de confirmer que la diminution de la dose du produit SDHI en seconde partie d'un programme fongicide ne sélectionnait pas de résistances et diminuait même la pression de sélection. La **manipulation de la dose est une tactique supplémentaire** à mettre en place en parallèle avec celle des mélanges de molécules à modes d'action différents (ex : triazoles+SDHI) afin de limiter l'émergence des résistances. Des programmes ajustés selon la nuisibilité attendue et sur l'évolution du prix du blé de l'année sont donc recommandés. L'essai en serres a confirmé la diversité de comportement des souches mais n'a pu mettre en lien direct la résistance et l'agressivité des souches.

Cette étude fournit les **premiers résultats d'évaluation** du niveau de la résistance aux carboxamides des populations belges de *Z. tritici* en Wallonie. Ceux-ci permettent de mettre en avant l'importance de la surveillance des résistances afin d'assurer une sécurité alimentaire et de guider nos choix dans les meilleures stratégies en matière de protection. La sélection variétale ainsi que l'utilisation de programmes fongicides efficaces permettront de répondre aux défis futurs et d'assurer une production agricole durable.