

Caractérisation de la résistance de *Zymoseptoria tritici* aux Inhibiteurs de la déméthylation dans la population belge

Présenté par Lucas Yzerbyt

Promoteur : Prof. Anne Legrève (UCL/ELI/ELIM)

Lecteurs : Prof. Xavier Draye (UCL/ELI/ELIA)
PhD Maxime Duvivier (CRA-W)
PhD Pierre Hellin (CRA-W)

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention
du diplôme de **Bioingénieur : Sciences Agronomiques**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice le Professeur Anne Legrève de m'avoir ouvert les portes de l'univers de la phytopathologie en me laissant l'opportunité unique de pouvoir travailler sur ce sujet enrichissant et fascinant. Je la remercie également pour sa confiance, son soutien, ses conseils et surtout pour son accueil chaleureux au sein de l'équipe du laboratoire de l'unité de phytopathologie de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve. J'ai eu la chance inouïe d'avoir pu compter sur l'aide de ma promotrice qui s'est toujours montrée disponible et je ne la remercierai jamais assez pour cela.

Secondement, j'aimerais plus particulièrement remercier Pierre Hellin de m'avoir accompagné, soutenu et conseillé tout au long de ce travail. Sa connaissance admirable en la matière et son professionnalisme m'ont permis d'avoir une meilleure compréhension du sujet et m'ont aidé dans la réalisation des diverses manipulations. Je voudrais le remercier pour l'investissement et l'énergie consacrés à la bonne réalisation de mon mémoire ainsi qu'au soutien qu'il a pu me donner tout au long de l'année.

Ensuite, je tiens évidemment à remercier Alice Nysten avec qui j'ai pu collaborer tout au long de l'année et sans qui ce mémoire n'aurait pas été faisable. Nous avons chacun pu apporter nos connaissances dans nos travaux respectifs et ce fut un réel plaisir de travailler ensemble. Je la remercie également pour son aide et ses conseils que ce soit au sein du laboratoire ou en dehors des heures de travail.

Je ne pourrais oublier de remercier Maxime Duvivier qui m'a conseillé à plusieurs reprises et grâce à qui j'ai pu obtenir des informations essentiels à la mise en place de ce travail.

Je remercie également toutes les personnes ayant réalisé les essais en champ à Ath et à Thy-le-Château, en particulier Olivier Mahieu (CARAH, Ath) et Maxime Duvivier (CRA-W, Gembloux).

Un grand merci à toute l'unité de phytopathologie de l'Université Catholique de Louvain-la-Neuve, en particulier à Charlotte, Viviane et Jean-Marie pour leur assistance technique et leurs explications vis-à-vis du fonctionnement des multiples installations du laboratoire.

Enfin, je voudrais remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu tout au long de l'année. Je remercie mes parents pour leur patience, leur disponibilité et leurs encouragements. Merci aussi à ma sœur qui est toujours là en cas de souci et à mon frère qui m'a donné le goût de découvrir le monde des Sciences. Je remercie ma Camille qui m'a supporté à chaque étape de ce travail que ce soit après une journée de manipulation ou une journée de rédaction.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
2.1 Impact de la septoriose du blé sur le marché	3
2.2 L'agent pathogène : <i>Z. tritici</i>	4
2.2.1 Caractéristiques biologiques du pathogène	4
2.2.2 Cycle biologique de <i>Z. tritici</i>	8
2.2.2.1 L'infection primaire par les ascospores	8
2.2.2.2 L'infection secondaire par les pycnidiospores	9
2.2.2.3 Fin de la saison culturale	11
2.2.3 Symptômes de la maladie et observations microscopiques	12
2.3 Lutte intégrée contre l'agent pathogène <i>Z. tritici</i>	14
2.3.1 Lutte prophylactique	14
2.3.1.1 Le choix variétal et les mélanges de variétés	14
2.3.1.2 Autres pratiques culturales	15
2.3.2 Lutte chimique	16
2.3.2.1 Application des traitements	16
2.3.2.2 Substances actives.....	18
<i>Inhibiteurs multisites</i>	19
<i>Methyl Benzimidazole Carbamates (MBCs)</i>	19
<i>Quinone outside Inhibitors (Qols) (famille des strobilurines)</i>	19
<i>Sterol Demethylation Inhibitors (DMIs)</i>	20
<i>Les carboxamides (SDHIs, Succinate Dehydrogenase Inhibitors)</i>	21
2.4 Evolution de la résistance de <i>Z. tritici</i> face aux DMIs.....	22
2.4.1 Mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance	22
2.4.2 Evolution des triazoles dans la lutte contre <i>Z. tritici</i>	24
2.4.3 Mutations associées aux résistances : relation phénotype-génotype	27
2.4.3.1 Les phénotypes de résistance	27
2.4.3.2 Mutations associées à des niveaux de résistance faibles – Classe phénotypique TriLR	29
2.4.3.3 Mutations associées à des niveaux de résistance moyens – Classe phénotypique TriMR	30
2.4.3.4 Mutations associées à des niveaux de résistance élevés – Classe phénotypique TriHR	31
2.4.4 Résistance croisée au sein des DMIs.....	32

2.5 Situation actuelle et recommandations en matière d'utilisation des DMI pour minimiser l'apparition des résistances chez <i>Z. tritici</i>	32
3. MATERIEL ET METHODES.....	33
3.1 Obtention et préparation des souches de <i>Z. tritici</i>	33
3.1.1 Souches de 2017	33
3.1.1.1 Isollements des souches de septoriose	35
3.1.1.2 Phase de collection.....	36
3.1.2 Souches de 2016	37
3.1.3 Souches de 2008-2009	37
3.2 Caractérisation <i>in vitro</i> de la sensibilité des souches de <i>Z. tritici</i> aux triazoles sur base des EC ₅₀ en plaque multipuits.....	38
3.2.1 Sélection des souches et préparation de l'inoculum	39
3.2.2 Préparation des fongicides.....	39
3.2.3 Inoculation des plaques multipuits	40
3.2.4 Lecture des plaques inoculées et traitement des données	41
3.3 Caractérisation moléculaire du gène CYP51 des souches de <i>Z. tritici</i>	42
3.3.1 Extraction de l'ADN des souches.....	42
3.3.2 Amplification en chaîne par polymérase (PCR) du gène CYP51.....	43
3.3.3 Electrophorèse sur gel d'agarose et purification des extraits d'ADN	45
3.3.3.1 Electrophorèse sur gel d'agarose	45
3.3.3.2 Purification d'ADN	45
3.3.4 Séquençage des fragments d'ADN et traitement des données	45
3.4 Evaluation de la valeur sélective des souches de <i>Z. tritici</i>	46
3.4.1 Préparation des conditions <i>in vivo</i> et du matériel végétal	47
3.4.2 Choix des souches de <i>Z. tritici</i>	48
3.4.3 Préparation de l'inoculum et du matériel végétal	48
3.4.4 Evaluation du développement de la maladie.....	50
4. RESULTATS.....	51
4.1 Analyse des essais réalisés sur deux champs belges durant les saisons culturales 2015-2016 et 2016-2017	52
4.2 Résultats de la caractérisation <i>in vitro</i> de la sensibilité des souches de <i>Z. tritici</i> aux triazoles sur base des EC ₅₀ en plaque multipuits.....	54
4.2.1 Evolution de la résistance des souches de <i>Z. tritici</i> isolées entre 2008 et 2017	54
4.2.2 Evolution de la résistance des souches de <i>Z. tritici</i> isolées entre 2016 et 2017	56
4.2.2.1 Effet du lieu de récolte et de l'année d'isolement.....	57

4.2.2.2 Effet du traitement fongicide et influence des interactions entre l'année d'isolement, le lieu de récolte et le type de traitement sur l'évolution de la résistance des souches des <i>Z. tritici</i>	59
<i>Résultats associés au prothioconazole</i>	59
<i>Résultats associés au tébuconazole</i>	61
4.2.3 Résistance croisée entre le prothioconazole et le tébuconazole	63
4.3 Résultats de la caractérisation moléculaire du gène CYP51 des souches de <i>Z. tritici</i>	64
4.3.1 Analyse des données moléculaires du gène CYP51 des souches de <i>Z. tritici</i>	64
4.3.2 Observations des polymorphismes d'acides aminés du gène CYP51 des souches de <i>Z. tritici</i>	65
4.3.2.1 Observations des génotypes associés aux souches sensibles	67
4.3.2.2 Observations des génotypes associés aux souches résistantes	67
4.3.3 Analyse de la relation phénotype-génotype des souches de <i>Z. tritici</i>	68
4.4 Analyse de la valeur sélective des souches de <i>Z. tritici</i>	72
5. DISCUSSION	74
5.1 Evolution de la résistance de <i>Z. tritici</i> au prothioconazole et au tébuconazole en Belgique	74
5.2 Performances des traitements fongicides en champ et impact de ceux-ci sur l'évolution de la résistance de <i>Z. tritici</i> aux DMIs	78
5.3 Comparaison des valeurs sélectives de souches résistantes et sensibles sur différentes variétés de blé	81
6. CONCLUSION	82

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : Dynamique annuelle des épidémies de la septoriose du blé dues à <i>Z. tritici</i> avec représentation des différentes sources d'inocula impliquées dans l'infection. Les flèches rouges et bleues illustrent respectivement les mouvements des ascospores et des pycnidiospores. La largeur des flèches indique l'intensité de cette source d'inoculum sur un plan quantitatif et donc l'importance du mécanisme employé. Les mécanismes concernant les premiers stades de développement du blé sont illustrés dans le rectangle noir ; 1 : ascospores transportées par le vent depuis des débris exogènes ; 2 : ascospores transportées par le vent depuis des débris endogènes ; 3 : ascospores transportées par le vent depuis des repousses spontanées ; 4 : ascospores transportées par le vent depuis des herbacées ; 5 : pycnidiospores dispersées par la pluie depuis des débris endogènes ; 6 : pycnidiospores dispersés par la pluie depuis des repousses spontanées ; 7 : pycnidiospores dispersés par la pluie depuis des feuilles basales sénescientes (d'après Suffert <i>et al.</i> , 2011)	7
FIGURE 2 : Cycle biologique de la septoriose causée par l'agent pathogène <i>Z. tritici</i> (d'après Ponomarenko <i>et al.</i> , 2011)	8
FIGURE 3 : Les symptômes de la septoriose, causée par l'agent pathogène <i>Z. tritici</i> , visibles sur une feuille de blé avec observation d'un ensemble de pycnides présent au sein d'une lésion mature (A) et de la sortie des cirrhes (B) (modifié de McMullen et Adhikari, 2016).....	12
FIGURE 4 : Les différentes structures de reproduction de l'agent pathogène <i>Z. tritici</i> . A gauche, la reproduction sexuée caractérisée par un pseudothèce (A), un asque et des ascospores (B). A droite, la reproduction asexuée caractérisée par une pycnide (C) contenant des pycnidiospores (D) (d'après Morais, 2015)	13
FIGURE 5 : Représentation des périodes d'infection des huit principales maladies en blé (flèches horizontales) et des cinq stades de croissance clé de la protection fongicide en blé (flèches verticales). Les stades de croissance sont évalués sur une échelle BBCH (d'après Bataille <i>et al.</i> , 2018)	16
FIGURE 6 : Les différents schémas de traitement fongicide mis en place pour lutter contre les principales maladies présentes dans nos cultures de blé en 2018. Les schémas de traitement non grisés n'ont pas été testés en Wallonie en 2017 durant les essais fongicides (d'après Bataille <i>et al.</i> , 2018)	17
FIGURE 7 : Sensibilité des souches de <i>Z. tritici</i> de Rothamsted au tébuconazole et à l'époxiconazole entre 2003 et 2006 avec regroupement des souches en fonction de l'augmentation des valeurs d'EC ₅₀ (modifié de Fraaije <i>et al.</i> , 2007)	25
FIGURE 8 : Sensibilité des souches de <i>Z. tritici</i> de Belgique à l'époxiconazole entre 2002 et 2009 avec regroupement du nombre de souches (%) en fonction de leur classe d'EC ₅₀ (µg/ml). Chaque couleur correspond à une année spécifique où n souches ont été étudiées (d'après Clinckemaillie, donnée non publiée)	26
FIGURE 9 : Effet <i>in vitro</i> des DMI sur la croissance de 19 souches de <i>Z. tritici</i> avec identification des divers phénotypes observés dans les isolats étudiés selon leur résistance face aux DMI. a : Valeurs moyennes d'EC ₅₀ calculées pour 6 isolats de type sauvage (TriS) ; b : Les facteurs de résistance moyens (EC ₅₀ souches TriR / EC ₅₀ souches TriS ; ND : Not Determined (non déterminé) (modifié de Leroux et Walker, 2011)	28
FIGURE 10 : Relation phénotypes-génotypes dans les souches de <i>Z. tritici</i> sensibles (TriS) et résistantes (TriR) aux fongicides DMI avec la présence possible d'autres mécanismes de résistance. Les différents polymorphismes font référence aux mutations actuellement reportées au sein des populations de <i>Z. tritici</i> et ont été identifiés par multiples équipes de chercheurs. MDR : Souches Multi Drug Resistant (modifié de Leroux et Walker, 2011)	29
FIGURE 11 : Milieu PDA + Chloramphénicol sur lequel deux conidies d'une souche de <i>Z. tritici</i> ont poussé pendant 3 à 4 semaines d'incubation à 20-22°C suivant l'isolement monoconidien de la souche et sur lequel la phase de collection est entamée.....	36
FIGURE 12 : Répartition des dilutions de fongicides et des suspensions conidiennes dans les 96 puits d'une plaque multipuits. Les 8 colonnes de la plaque sont remplies avec une concentration de fongicide spécifique (mg/l) selon la colonne, sauf pour la première (0 mg/l). Ensuite, les lignes 2 à 12 de la plaque sont inoculées (+) avec 11 souches différentes (une même souche par ligne), avec une souche de référence dans la deuxième ligne qui est analysée dans chaque plaque comme contrôle interne. La première ligne n'est pas inoculée	40

FIGURE 13 : Inoculation d’une solution de spores dans la zone délimitée sur la F3 d’une plantule de blé	49
FIGURE 14 : Table de culture recouverte d’une bâche utilisée lors de ce mémoire afin d’atteindre une humidité relative maximale à l’intérieur de celle-ci pendant minimum 72 heures pour favoriser l’infection du blé par <i>Z. tritici</i>	50
FIGURE 15 : Sévérité (pourcentage de la surface foliaire atteinte) de la septoriose observée à Ath et à Thy-le-Château en 2016 (A et C) et en 2017 (B et D) en fonction du traitement fongicide (témoin, T1, T2 et T3) appliqué durant la saison culturale respective. La sévérité a été cotée sur la F1 (A et B) et F2 (C et D) d’un nombre déterminé de plantes issues des différentes parcelles traitées ou non traitées. En rouge, l’évolution du rendement (kg/ha) sur les deux années consécutives par rapport à chaque champ et chaque traitement fongicide	52
FIGURE 16 : Evolution de la résistance des souches de <i>Z. tritici</i> isolées en Belgique entre 2008 et 2017 face au prothioconazole (A et B) et au tébuconazole (C et D). (A) et (C) : Diagrammes en boîte à moustaches (box-plot) comparant la tendance des valeurs log d’EC ₅₀ (µg/ml) obtenues pour les populations de souches de <i>Z. tritici</i> de 2008 (n=39), 2009 (n=24), 2016 (n=29) et 2017 (n=32) face au prothioconazole (A) et au tébuconazole (C). (B) et (D) : Histogrammes en bâtons illustrant la distribution de la sensibilité de <i>Z. tritici</i> face au prothioconazole (B) et au tébuconazole (D) en termes du nombre de souches associé à chaque classe d’EC ₅₀ (mg/l) et ceci en fonction des quatre années de récolte 2008 (n=39), 2009 (n=24), 2016 (n=29) et 2017 (n=32)	55
FIGURE 17 : Evolution de la résistance des souches de <i>Z. tritici</i> récoltées et isolées entre 2016 et 2017 à partir de deux champs belges (Ath et Thy-le-Château) face au prothioconazole (A et B) et au tébuconazole (C et D). (A) et (C) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d’EC ₅₀ (µg/ml) obtenues pour les populations de souches de 2016 (n=113) et de 2017 (n=130) face au prothioconazole (A) et au tébuconazole (C) au niveau des deux champs. (B) et (D) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d’EC ₅₀ (µg/ml) obtenues pour les populations de souches de Ath (n=127) et de Thy-le-Château (n=116) face au prothioconazole (B) et au tébuconazole (D) au niveau des deux années de récolte.	57
FIGURE 18 : Evolution de la résistance des souches de <i>Z. tritici</i> récoltées entre 2016 et 2017 face au prothioconazole en fonction du traitement fongicide imposé. (A) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant l’effet global de chaque traitement fongicide sur le comportement de <i>Z. tritici</i> en Belgique entre 2016 et 2017 (B) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d’EC ₅₀ (µg/ml) obtenues pour les diverses populations de souches en fonction du traitement fongicide et de l’interaction existante avec l’année d’isolement et le lieu de récolte des souches.	59
FIGURE 19 : Evolution de la résistance des souches de <i>Z. tritici</i> récoltées entre 2016 et 2017 face au tébuconazole en fonction du traitement fongicide imposé. (A) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant l’effet global de chaque traitement fongicide sur le comportement de <i>Z. tritici</i> en Belgique entre 2016 et 2017 (B) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d’EC ₅₀ (µg/ml) obtenues pour les diverses populations de souches en fonction du traitement fongicide et de l’interaction existante avec l’année d’isolement et le lieu de récolte des souches.	61
FIGURE 20 : Résistance croisée entre le prothioconazole et le tébuconazole évaluée sur un total de 306 souches belges de <i>Z. tritici</i> isolées entre 2008 et 2017	63
FIGURE 21 : Sévérité de 25 souches de septoriose, classées en abscisse selon leur niveau de résistance au prothioconazole, sur quatre variétés de blé. Les classes de sévérité correspondent à un pourcentage de surface foliaire atteint (%) par les symptômes caractéristiques de la septoriose. Cette surface de symptômes a été évaluée sur chaque feuille d’intérêt dans la zone délimitée de 5 cm et selon une échelle de cotation allant de 1 à 6 (1=0-5% ; 2=5-10% ; 3=10-20% ; 4=20-40% ; 5=40-60% ; 6=60-90%). La cotation des neuf feuilles inoculées avec la même souche a été cumulée par variété. Encadré en bleu : les séries de feuilles non inoculées (Témoin et Tween) et inoculées par une souche de France résistante aux DMIs (09-BDEb) et une souche d’Irlande sensible aux DMIs (OP_15_13)	72

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Propriétés des deux champs analysés en 2016 et 2017 selon divers paramètres agricoles, environnementaux et géographiques.....	34
TABLEAU 2 : Descriptif des traitements appliqués durant la saison 2015-2016 (utilisation d'Input (160 g/l prothioconazole (Triazolinthione) + 300 g/l spiromine (Spirocétamine)) au lieu de Kestrel) et durant la saison 2016-2017, de leur dose, matière active, composition, classe, moment d'application sur la plante et de la firme phytopharmaceutique qui les commercialise.	35
TABLEAU 3 : Quantité des différents réactifs PCR à insérer dans le mix après avoir multiplié par n échantillons pour la PCR ciblant le gène CYP51	44
TABLEAU 4 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène CYP51 de <i>Z. tritici</i>	46
TABLEAU 5 : Variétés de blé employées sur base de leur cotation et leur sensibilité vis-à-vis de la septoriose en 2017. Les cotations du niveau de résistance proviennent du Livre Blanc Céréales (Edition 2018) et nous ont été transmises par Maxime Duvivier (CRA-W) excepté pour la variété Chevalon	47
TABLEAU 6 : Les polymorphismes d'acides aminés et la position de ceux-ci dans le gène CYP51 de 27 souches de <i>Z. tritici</i> récoltées entre 2008 et 2017 en Belgique. Les souches ont été réparties selon leur catégorie de résistance face au tébuconazole et au prothioconazole et selon l'année de récolte. La fréquence de survenue d'une mutation à l'intérieur de chaque catégorie a été calculée. Les positions d'acides aminés en vert ont déjà été mentionnées dans la littérature (Cools <i>et al.</i> , 2013) tandis que celle marquée en orange fait référence à une nouvelle mutation découverte durant l'étude.....	66
TABLEAU 7 : Description des phénotypes et génotypes du gène CYP51 associés aux souches de <i>Z. tritici</i> isolées entre 2008 et 2017 et caractérisées moléculairement durant cette étude. Le tableau ne reprend que les souches dont l'entière du gène CYP51 a pu être visualisé (n = 24). Les informations et la nomenclature permettant de mettre au point le tableau sont décrites par Leroux et Walker (2011) et Huf <i>et al.</i> (2018) cependant d'autres génotypes sont susceptibles d'exister et ont déjà été mentionnés dans des travaux similaires	69

1. INTRODUCTION

En raison de sa position centrale dans l'alimentation humaine, le blé est depuis très longtemps l'une des céréales les plus cultivées sur Terre. Il s'agit aussi d'une des cultures céréalières les plus fortement touchées par les maladies fongiques dans le monde occidental et au Moyen-Orient, où sa production est massive. Parmi celles-ci, la septoriose du blé, causée par l'agent pathogène *Zymoseptoria tritici*, est une maladie touchant les feuilles des blés et induisant des pertes de rendement pouvant aller jusqu'à 50% dans nos régions. En effet, *Z. tritici* est un champignon doté d'une double voie de reproduction sexuelle et d'un génome ayant une plasticité élevée lui permettant de s'adapter rapidement à de nouvelles contraintes. De plus, les conditions climatiques dans les pays européens tels que la Belgique, la France, l'Allemagne et l'Angleterre sont idéales pour son développement et sa progression rapide dans les cultures faisant de cette maladie une réelle menace chaque année.

La lutte intégrée contre l'agent *Z. tritici* est indispensable pour assurer des rendements élevés. Depuis des années, cette lutte repose principalement sur l'utilisation de variétés de blé résistantes et sur l'application de fongicides à des stades de développement précis de la plante. Plusieurs familles de produits chimiques sont utilisées pour contrôler la maladie. On distingue les produits de contact, tels que les inhibiteurs multisites, des produits systémiques avec notamment les strobilurines (Qols), les inhibiteurs de déméthylation (DMIs), les dérivés de benzimidazole (MBCs) et les inhibiteurs de la succinate déshydrogénase (SDHIs). La première catégorie, encore utilisée à ce jour, va assurer une action préventive contre la maladie et cibler de multiples voies métaboliques à la fois tandis que les produits systémiques vont plutôt avoir une action curative, préventive et spécifique sur la maladie.

L'apparition rapide de souches fortement résistantes aux Qols et aux MBCs, due à des modifications alléliques au sein du génome fongique, a induit l'exclusion de ces deux familles de fongicides hors des programmes de traitement mis en place contre la septoriose. En revanche, les triazoles, classe principale des DMIs, sont utilisés majoritairement depuis les années 80' et offrent une large gamme de substances actives face à *Z. tritici*. Ils inhibent l'activité de l'enzyme 14 α -déméthylase dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, un constituant essentiel dans la membrane plasmique du champignon. Ceci provoque la détérioration de la membrane suivie de la mort cellulaire, rendant la survie impossible pour le champignon.

Malgré la découverte de multiples mutations au sein du gène cible des triazoles, le gène CYP51, aucune souche complètement résistante n'a été détectée pour le moment. Ainsi, la

résistance face à ces produits reste partielle signifiant que les triazoles gardent une certaine efficacité face à la septoriose. Cependant, depuis le début du 21^{ème} siècle, la fréquence de souches exprimant des résistances moyennes à fortes augmente de manière fulgurante. En effet, les mutations au sein du gène CYP51 et les combinaisons spécifiques entre celles-ci deviennent de plus en plus récurrentes au sein des populations de *Z. tritici* dans nos régions. De plus, de nouvelles mutations et associations de mutations sont continuellement découvertes. Ainsi, le contrôle est réalisé grâce à l'utilisation de plusieurs triazoles en alternance et via la synthèse de nouvelles substances plus actives que les anciennes. Malheureusement, des isolats exprimeraient des facteurs de résistance élevés face à tous les DMIs utilisés à ce jour indiquant que d'autres mécanismes de résistance joueraient un rôle primordial dans cette lutte.

Dans le cadre de ce mémoire, l'objectif a été d'étudier le comportement de populations belges (306 souches) de *Z. tritici* récoltées dans plusieurs champs et à des moments différents (2008, 2009, 2016 et 2017) afin de caractériser l'évolution de la résistance de *Z. tritici* face aux DMIs en Belgique. L'étude a porté sur deux DMIs essentiels dans la lutte contre la septoriose : le tébuconazole, employé depuis la fin des années 90', et le prothioconazole, introduit au début des années 2000 et très fortement utilisé à ce jour. Ainsi, une caractérisation *in vitro* de la sensibilité de ces souches a été réalisée afin d'évaluer la résistance de *Z. tritici* en Belgique en fonction de l'année et en fonction de la substance active. Une analyse supplémentaire a été effectuée au niveau des souches de 2016 et de 2017 pour examiner l'effet d'un traitement fongicide au champ sur la sélection de résistance chez *Z. tritici*. Ensuite, la caractérisation moléculaire des souches ayant des niveaux de résistance particulièrement élevés a été effectuée par le séquençage du gène CYP51. Finalement, la valeur sélective de ces mêmes souches a été étudiée afin d'évaluer si les souches les plus contraignantes au laboratoire l'étaient également au champ. L'étude a permis de mettre à jour la situation actuelle de la résistance de *Z. tritici* face aux deux DMIs en Belgique et de fournir des informations intéressantes pour la mise au point d'un programme de traitement fongicide plus durable et plus responsable.

La première partie de ce travail consiste en une revue bibliographique décrivant les propriétés de l'agent pathogène, la maladie qu'il génère et les moyens de lutte associés. La deuxième partie décrit l'ensemble du matériel et des méthodes employés pour répondre aux objectifs de l'étude. Les résultats sont présentés dans une troisième partie et discutés dans une quatrième partie. Enfin, une conclusion du travail est reprise dans une cinquième et dernière partie.

2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Impact de la septoriose du blé sur le marché

La production mondiale de blé ne cesse d'augmenter chaque année, positionnant cette graminée à la deuxième place parmi les céréales les plus cultivées au monde juste après le maïs. En effet, le blé possède une qualité nutritive intéressante pour la santé de l'homme et de l'animal. Sa consommation est devenue prépondérante dans la vie quotidienne de l'être humain d'où l'évolution significative de sa production annuelle depuis les dernières décennies avec plus de 750 millions de tonnes prévues pour l'année 2017-2018 (FAO, Avril 2018). Pour une production de cette ampleur, il est donc impératif d'appliquer des mesures de contrôle efficaces afin de limiter au maximum les pertes de rendement dues aux attaques parasitaires ou autres infections causées par des agents pathogènes.

Parmi ces différentes maladies, la septoriose du blé est probablement la plus préoccupante à ce jour. Selon une campagne organisée par Bayer en 2008, la perte de rendement moyenne en France causée par cette maladie est estimée à 28.5 quintaux/hectare, ce qui revient à environ 31% de la production (Mas, 2009). Lors de sévères épidémies, elle peut causer des pertes de rendement pouvant même aller jusqu'à 50% de la récolte (Eyal *et al.*, 1987 ; Fones et Gurr, 2015). La septoriose est donc assurément une menace importante nécessitant un contrôle adéquat.

Les septorioses du blé les plus communes peuvent être réparties en trois catégories, toutes les trois étant associées à des champignons ascomycètes de la famille des Mycosphaerellaceae, plus précisément du genre *Septoria*. La moins conséquente des trois maladies est celle causée par *Leptosphaeria avenaria* f. sp. *triticea* (anamorphe : *Septoria avenae* f. sp. *triticea*). Ce champignon se retrouve quasi exclusivement dans le nord des Etats-Unis et au Canada ayant ainsi peu d'impact au niveau international. De plus, son mécanisme d'action est peu connu car la maladie provoquée par ce champignon est encore relativement nouvelle. Les deux autres espèces, *Parastagonospora nodorum* (anamorphe : *Septoria nodorum*) et *Zymoseptoria tritici* (téléomorphe : *Mycosphaerella graminicola*) (anamorphe : *Z. tritici*), sont omniprésentes sur le globe (Eyal *et al.*, 1987 ; Mehta, 2014). *P. nodorum* a longtemps été l'espèce dominante en Europe, surtout dans le nord où les conditions humides favorisent sa prolifération tandis que *Z. tritici* était plutôt inféodé aux régions méditerranéennes. Depuis les années '80, les changements dans les cultivars et les pratiques culturales ainsi que l'évolution de la diversité génétique de *Z. tritici* ont permis à cet agent pathogène d'étendre son impact et sa virulence à plus grande échelle jusqu'à même prendre le dessus sur *P. nodorum* (Eyal *et al.*, 1987 ; Gigot *et al.*, 2014). Aujourd'hui, la septoriose du

blé engendrée par *Z. tritici* est à l'origine de ces pertes de rendement significatives mentionnées auparavant. Le mécanisme d'action et l'évolution génétique derrière tout ceci suscitent clairement l'attention des chercheurs à travers le monde entier.

2.2 L'agent pathogène : *Z. tritici*

2.2.1 Caractéristiques biologiques du pathogène

L'agent pathogène à l'origine de la septoriose de blé est connu sous le nom général *Z. tritici*. En effet, en fonction des conditions environnementales et du stade d'infection du pathogène, ce champignon ascomycète peut se retrouver sous deux formes distinctes. D'une part, une forme asexuée appelée *S. tritici* (anamorphe) décrite initialement en 1842, d'autre part une forme sexuée connue sous le nom de *M. graminicola* (téléomorphe) décrite pour la première fois en Nouvelle-Zélande en 1972 par Sanderson. Celui-ci a pu mettre en évidence l'importance de la forme sexuée dans l'épidémiologie de la maladie et ainsi créer le premier lien entre les deux formes (Sanderson, 1972 ; Eyal *et al.*, 1987). En Belgique, la forme sexuée a pu être observée pour la première fois en 2005 (Dumont *et al.*, 2006).

Depuis peu, l'appellation de la forme asexuée, *S. tritici*, a été changée en *Z. tritici* pour des raisons phylogénétiques cependant laissant l'appellation de la forme sexuée, *M. graminicola*, inchangée. Pour des raisons de facilité et afin d'éviter toute confusion, le nom générale *Z. tritici* a été acceptée, faisant référence aux deux formes du champignon à la fois (Quaedvlieg *et al.*, 2011).

Les deux formes de *Z. tritici* participent différemment à la survie et la prolifération du pathogène en produisant deux catégories de spores. Lors du stade sexué, le champignon produit des ascospores se trouvant dans des asques gardés dans des fructifications précises appelées pseudothèces. A maturité, chaque ascospore possède en moyenne 26 asques avec un nombre de 8 ascospores par asque (Eriksen et Munk, 2003). Ces ascospores jouent un rôle crucial au tout début du cycle d'infection et sont considérées comme étant la source principale d'inoculum pour déclencher la maladie. Il s'agit d'un champignon hétérothallique avec un système d'accouplement bipolaire (Sanderson et Hampton, 1978 ; Kema *et al.*, 1996 ; Suffert *et al.*, 2011). La formation des ascospores exige donc la rencontre de deux souches de types sexuels (= mating type) opposés, une souche de type MAT1-1 et une souche de type MAT1-2. Selon plusieurs études, les ascospores peuvent être dispersées par le vent sur de longues distances. Protégées dans leur pseudothèces sur les débris de la culture, elles permettent également au champignon de survivre en dehors de la saison culturale lorsque les conditions sont défavorables (Shaw et Royle, 1989 ; Suffert *et al.*, 2011). C'est cette reproduction sexuée qui est à l'origine de la diversité génétique élevée au sein de cette espèce. En effet, de

nombreuses études sur des populations de *Z. tritici* venant de différents continents ont été menées afin d'observer la variabilité génétique de ce champignon (Linde *et al.*, 2002 ; McDonald et Linde, 2002 ; Simón *et al.*, 2012 ; Drabešová *et al.*, 2013). Ils s'avèrent que les flux de gènes au sein d'une population et entre populations sont très importants expliquant ainsi l'apparition surprenante de résistances face aux divers fongicides appliqués à ce jour et dans le passé. Selon des expériences réalisées par Drabešová *et al.* (2012), un total de 158 génotypes différents sur 184 isolats a pu être observé sur des populations de *Z. tritici* venant de sept champs de blé à travers la Tchéquie. Elles démontrèrent aussi une différence marquée avec les populations issues d'autres pays européens. Les populations de *Z. tritici* présentent clairement une variabilité génétique impressionnante aussi bien sur le plan régional que sur le plan international (Linde *et al.*, 2002 ; Suffert *et al.*, 2011 ; Simón *et al.*, 2012 ; Drabešová *et al.*, 2012).

Lors du stade asexué, *Z. tritici* produit des conidies ou pycnidiospores dans des fructifications asexuées appelées pycnides. Leur production se fait via un système de cycles infectieux successifs allant jusqu'à 6 cycles par saison dans certains cas. Une seule feuille pourrait porter 400 pycnides et environ 300 pycnidiospores viables peuvent être produites dans une seule pycnide (Fones et Gurr, 2015). Contrairement aux ascospores, ces conidies ou pycnidiospores sont majoritairement produites durant la phase épidémique et sont dispersées sur de courtes distances via les gouttelettes de pluie (Eyal *et al.*, 1987 ; Cordo *et al.*, 1999 ; Saint-Jean *et al.*, 2004). C'est au début du printemps, après les premières infections, que les conditions idéales de température et de précipitation sont réunies afin d'assurer le déclenchement des multiples cycles de reproduction asexuée qui permettront l'amplification de l'épidémie (Shaw et Royle, 1989 ; Shaw et Royle, 1993). Une fois que les pycnides envahissent les feuilles infectées, les caractéristiques physiologiques de la plante et les conditions climatiques (température, humidité, ...) détermineront le comportement de la plante vis-à-vis de l'infection parasitaire. Pour la plante, il s'agit clairement d'une course contre la montre (Morais, 2015).

Pendant longtemps les chercheurs étaient persuadés que chaque forme était présente uniquement durant un moment précis de l'année, c'est-à-dire *Z. tritici* avec ses pycnidiospores au début du printemps jusqu'à la fin de l'été et *M. graminicola* avec ses ascospores au début de l'automne jusqu'à la fin de l'hiver pour assurer la survie du champignon sur les débris et jouer le rôle d'inoculum primaire en début de culture. Néanmoins, plusieurs expériences telles que celles réalisées par Hunter *et al.* (1999) et Eriksen et Munk (2003) ont démontré le contraire. En effet, des ascospores auraient été observées durant la saison culturale sur les mêmes feuilles que celles infectées par la forme asexuée du champignon. En Belgique, ce

phénomène a également pu être visualisé grâce aux recherches menées par Duvivier *et al.* (2015) durant lesquelles des symptômes ont été observés sur les étages foliaires supérieurs d'une plante dont les étages foliaires inférieurs ne présentaient pas de symptômes et ceci après avoir détecté la présence d'ascospores dans l'air autour de la zone d'étude. Ainsi, les ascospores présenteraient un rôle supplémentaire que celui d'inoculum primaire de la maladie en participant également à la prolifération et multiplication de l'espèce durant la phase épidémique. Cependant, leur présence est plus tardive car selon Eriksen et Munk (2003) les ascospores seraient visibles seulement 29 à 53 jours après l'apparition de pycnides. Comme expliqué précédemment, une rencontre entre deux types sexuels opposés est impérative ce qui expliquerait en partie le temps d'apparition retardée de ces spores sexuées. Le nombre d'ascospores sur les feuilles augmenteraient au fur et à mesure que la saison culturale avance et leur propagation se ferait verticalement, de feuille en feuille. Il s'agirait probablement d'une stratégie de survie employée par *Z. tritici* afin de se préparer pour le développement et la dissémination de la forme sexuée avant que la saison culturale se termine et que les conditions deviennent défavorables à la survie du pathogène et de son hôte (Hunter *et al.*, 1999 ; Eriksen et Munk, 2003 ; Suffert *et al.*, 2011). Plusieurs recherches telles que celles réalisées par Brokenshire (1975) et Scott *et al.* (1988) ont également observé l'inverse, c'est-à-dire une présence de pycnidiospores en dehors de la période épidémique. Ces spores asexuées seraient capables de survivre sur des chaumes et des feuilles détériorées pendant plusieurs mois qui suivent la récolte. En revanche, Eyal *et al.* (1987) précise que *Z. tritici* ne serait pas en mesure de produire de nouvelles pycnides sur des tissus morts. Ainsi, le nombre de pycnidiospores dans chaque pycnide diminuerait au fur et à mesure après leur production. Comme lors de la phase épidémique, ces spores asexuées seraient dispersées par les gouttelettes de pluie pouvant ainsi prendre le rôle d'inoculum primaire dans des champs où les chaumes de blé sont gardés dans le sol jusqu'à la culture suivante (Brown *et al.*, 1978 ; Suffert *et al.*, 2011).

Aujourd'hui, il est clair que les deux types de reproduction de *Z. tritici* dominent chacune une période précise, cependant cela n'exclut pas le fait qu'elles soient inactives durant l'autre période de l'année. Bien au contraire, le rôle complet et final de ces différents types de spores serait bien plus complexe que l'on ne le pense. Ainsi, la capacité du pathogène à déclencher la maladie que ce soit au niveau de la plantule ou de la plante adulte ne se limite plus à une 'simple' infection en deux phases mais implique énormément de mécanismes différents comme visible sur la figure 1 illustrant la dynamique annuelle de la septoriose du blé.

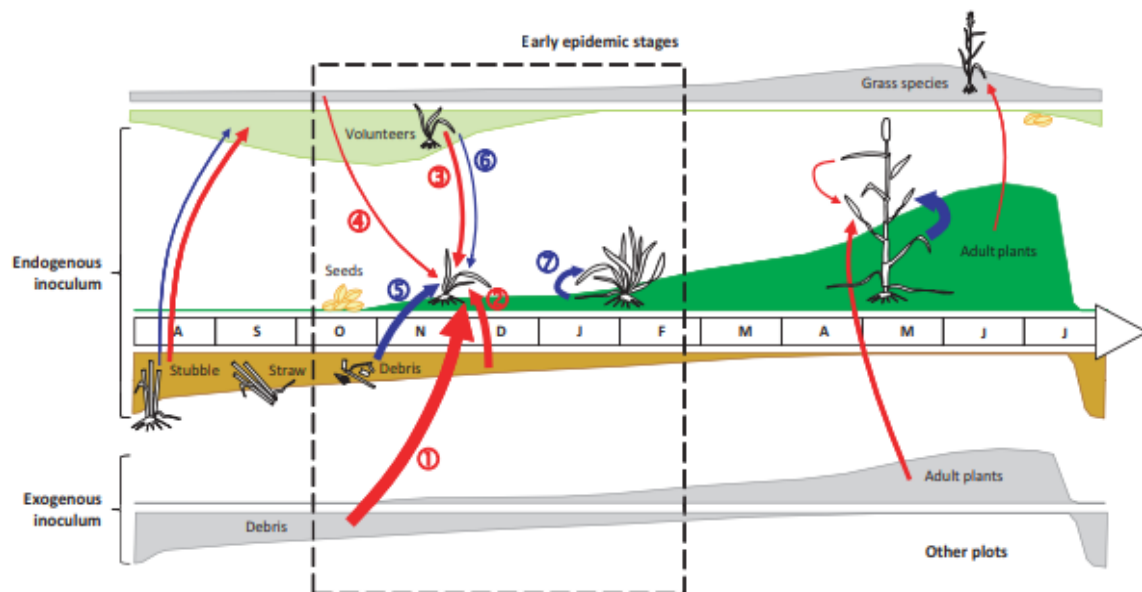


Figure 1 : Dynamique annuelle des épidémies de la septoriose du blé dues à *Z. tritici* avec représentation des différentes sources d'inocula impliquées dans l'infection. Les flèches rouges et bleues illustrent respectivement les mouvements des ascospores et des pycnidiospores. La largeur des flèches indique l'intensité de cette source d'inoculum sur un plan quantitatif et donc l'importance du mécanisme employé. Les mécanismes concernant les premiers stades de développement du blé sont illustrés dans le rectangle noir ; 1 : ascospores transportées par le vent depuis des débris exogènes ; 2 : ascospores transportées par le vent depuis des débris endogènes ; 3 : ascospores transportées par le vent depuis des repousses spontanées ; 4 : ascospores transportées par le vent depuis des herbacées ; 5 : pycnidiospores dispersées par la pluie depuis des débris endogènes ; 6 : pycnidiospores dispersés par la pluie depuis des repousses spontanées ; 7 : pycnidiospores dispersés par la pluie depuis des feuilles basales sénescentes (d'après Suffert *et al.*, 2011).

La figure 1 nous explique comment les différentes sources d'inoculum contribuent à l'infection de la plante lors des premiers stades de l'épidémie ainsi que chez la plante adulte. Ainsi, les recherches effectuées par Suffert *et al.* (2011) montrent l'importance des ascospores disséminées par le vent depuis des débris de blé endogènes (du champ) et exogènes (d'un autre champ) lors des premiers stades du blé dans l'épidémie de la maladie. Les autres sources gardent cependant une importance non négligeable dans le déclenchement de l'épidémie.

Une fois au stade adulte, les résultats obtenus indiquent que la dispersion verticale des pycnidiospores par la pluie est dominante mais qu'une légère dispersion d'ascospores entre plantes adultes peut également se produire (Suffert *et al.*, 2011). En effet, comme expliqué précédemment, les études réalisées par Duvivier *et al.* (2015) sur l'inoculum aérien en Belgique indiquent une présence d'ascospores tout au long de l'année avec des pics en automne, au printemps et en été. Ainsi, ce phénomène de dispersion d'ascospores pourrait prendre plus d'ampleur que ce que l'on pense.

2.2.2 Cycle biologique de *Z. tritici*

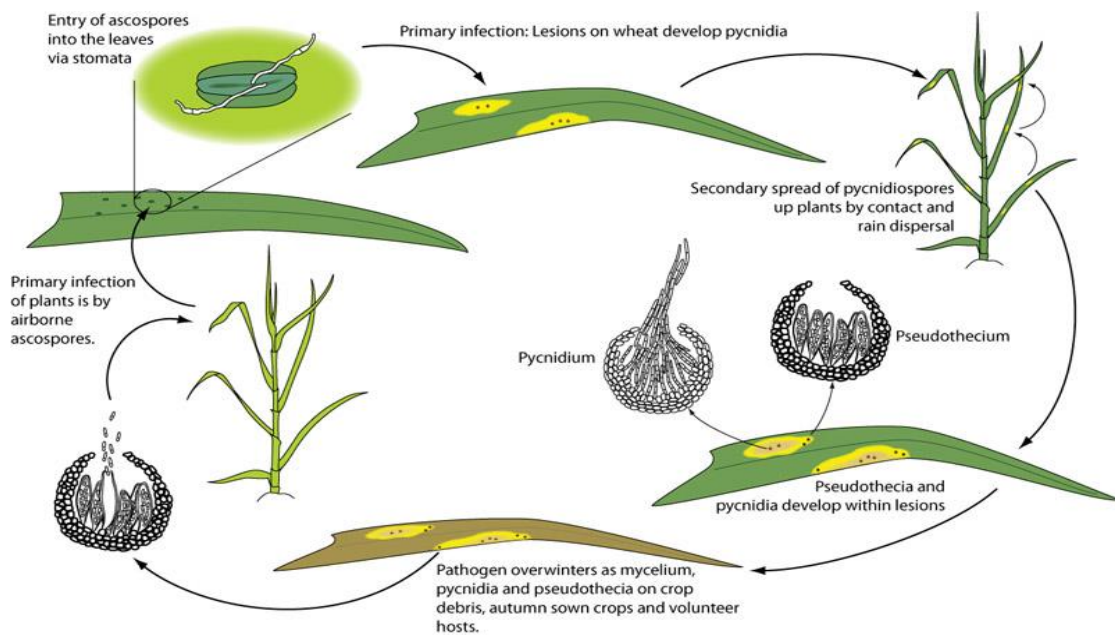


Figure 2 : Cycle biologique de la septoriose causée par l'agent pathogène *Z. tritici* (d'après Ponomarenko *et al.*, 2011).

Comme expliqué préalablement et illustré sur la figure 2, *Z. tritici* possède deux types de propagules infectieuses donc deux cycles infectieux vont entrer en jeu. Le cycle biologique sera détaillé dans ce paragraphe en commençant par ce qui a lieu chronologiquement dans la nature: l'infection primaire d'une plantule par des ascospores à la fin de l'automne - l'infection secondaire par des pycnidiospores durant la saison culturale - la survie du pathogène après la récolte.

2.2.2.1 L'infection primaire par les ascospores

Lorsque les conditions d'humidité et de température sont idéales, notamment une humidité relative élevée et une température entre 10 à 25°C, les pseudothèces libèrent des ascospores qui à leur tour profitent du vent pour déclencher l'épidémie sur les feuilles des jeunes plantules de blé (Sanderson et Hampton, 1978 ; Shaw et Royle, 1989 ; Suffert *et al.*, 2011). L'infection par *Z. tritici* débute par une croissance biotrophe (Steinberg, 2015). L'ascospore va germer et produire un tube germinatif doté d'un appressorium. Ce dernier permet au pathogène de pénétrer dans les tissus de la feuille via les stomates. Une fois dans la chambre stomatique, des hyphes se développent et colonisent rapidement les espaces intercellulaires (mésophylle) entourant les stomates. Ceci a lieu en moyenne 24 heures après l'infection primaire (Kema *et al.*, 1996 ; Duncan et Howard, 2000). Jusqu'à présent, aucune preuve d'existence d'un haustorium ou autre structure d'alimentation n'a été signalée (Kema *et al.*, 1996 ; Steinberg, 2015). Les chercheurs n'ont toujours pas su déterminer comment le

champignon se nourrit durant ce stade de croissance (Sanchez-Vallet *et al.*, 2013 ; Steinberg, 2015). Après 3 à 5 jours, le pathogène a complètement colonisé la zone entourant le site d'infection initial. Les expériences menées par Duncan et Howard (2000) indiquent un début de chlorose visible à l'œil nu seulement 7 à 9 jours suivant l'infection. Il s'agirait de la formation de pré-pycnides signifiant ainsi la fin de la phase biotrophe et le début de la phase nécrotrophe. Les pré-pycnides se forment dans les cavités sous-stomatiques via la croissance intensive des hyphes. Après 10 à 11 jours, la mort cellulaire programmée des cellules végétales prend place et les pycnides, issues de la fusion d'une multitude d'hyphes, deviennent matures. D'après un travail réalisé par Shetty *et al.* (2007), la mort des cellules végétales entraînerait un relargage de sucres et autres nutriments. Le champignon assimilerait ces derniers afin de favoriser sa prolifération et son développement. La désintégration des tissus foliaires apparaît comme des taches noires et brunes sur la surface foliaire, facilement visibles à l'œil nu. Ensuite, la maladie continue à se propager afin d'infecter l'entièreté de la feuille (Kema *et al.*, 1996 ; Duncan et Howard, 2000 ; Palmer et Skinner, 2002). Les laps de temps et les étapes mentionnés ci-dessus représentent une situation propre à certaines conditions. En effet, ces étapes se feront plus rapidement et de façon plus efficace si la souche est plus virulente mais plus difficilement si la plante hôte est plus résistante au pathogène. Les conditions environnementales jouent également un rôle primordial car elles peuvent favoriser ou défavoriser cette infection primaire (Eyal *et al.*, 1987). Les mesures de temps décrites ci-dessus illustrent le cas où les conditions sont optimales, c'est-à-dire une température entre 20 à 25°C et une humidité élevée. Il est très important de prendre ceci en compte car cela explique pourquoi les différentes recherches (Eyal *et al.*, 1987 ; Kema *et al.*, 1996 ; Duncan et Howard, 2000 ; Palmer et Skinner, 2002 ; Steinberg, 2015) n'indiquent pas toujours les mêmes laps de temps par rapport aux différentes phases de l'infection. Shipton *et al.* (1971) parlent même d'une phase latente pouvant aller de 6 à 36 jours. Aujourd'hui, il est clair que les conditions climatiques vont avoir la plus grande influence sur le processus d'infection de *Z. tritici* (Eyal *et al.*, 1987).

2.2.2.2 L'infection secondaire par les pycnidiospores

Une fois les pycnides arrivées à maturité, l'infection secondaire peut prendre place. En général, on retrouve une pycnide par cavité sous-stomatique. Ces fructifications asexuées produisent à leur tour des conidies connues sous le nom de pycnidiospores. Ce n'est que lorsque des conditions d'humidité précises sont présentes que les pycnides relâchent ces spores asexuées. Elles sont alors exsudées dans une matrice extracellulaire appelée cirrhe (Eyal *et al.*, 1987 ; Kema *et al.*, 1996 ; Palmer et Skinner, 2002). Les recherches d'Eyal *et al.*

(1987) précisent que le relargage de pycnidiospores par une pycnide s'effectue quand la feuille a été mouillée pendant minimum 30 minutes. Elles démontrèrent également que le cirrhe est en réalité un milieu de conservation, constitué de sucres et de protéines, qui permet aux conidies de survivre lorsque les conditions optimales sont remplacées par des conditions défavorables comme un temps trop sec. De plus, le cirrhe favoriserait la dispersion rapide et l'adhésion des pycnidiospores sur toute la surface de la feuille grâce à ses propriétés hygroscopiques (Duncan et Howard, 2000).

C'est au début du printemps que la dispersion des pycnidiospores se déroule. Celle-ci se fait majoritairement sous l'action de gouttelettes de pluie qui, une fois arrivées sur la feuille, propulsent l'inoculum depuis les feuilles inférieures vers les feuilles supérieures. On parle d'un transport vertical qui se produit jusqu'à ce que le sommet de la plante soit atteint. L'autre méthode de dispersion largement employée se déroule grâce à un contact entre des feuilles préalablement infectées et des feuilles nouvellement formées de deux plantes adjacentes. Il s'agit d'une dispersion horizontale ne nécessitant pas de conditions de pluie mais juste que les feuilles de chaque plante se trouvent à la même hauteur et qu'elles se chevauchent parfaitement. Ces deux moyens de dispersion ont été le plus souvent observés et sont à ce jour les plus utilisés par *Z. tritici* (Lovell *et al.*, 1997 ; Palmer et Skinner, 2002 ; Duvivier *et al.*, 2015). Néanmoins, il existe d'autres mécanismes de dispersion des pycnidiospores. Lovell *et al.* (1997) ont pu observer un transfert d'inoculum depuis les feuilles inférieures vers le sommet de la canopée sans que la pluie n'intervienne. En effet, le chevauchement entre les différentes feuilles d'une même plante pourrait provoquer la dispersion verticale des spores asexuées du bas de la plante jusqu'au sommet de celle-ci. Dans une expérience parallèle, ils ont remarqué que la pluie pouvait favoriser non seulement la dispersion verticale au sein d'une même plante, mais également la dispersion horizontale entre différentes plantes dont les feuilles se trouvaient à la même hauteur. Plusieurs mécanismes peuvent donc être employés par le pathogène pour assurer sa prolifération au sein de la plante et de la parcelle. La structure de la canopée et de la plante individuellement ainsi que les conditions environnementales jouent un rôle majeur dans la dispersion de ces spores asexuées et donc de la maladie. C'est une fois au sommet de la canopée que la maladie cause des dégâts importants et inquiétants par rapport au rendement. En effet, les deux dernières feuilles (F1 définitive et F2 définitive) sont les feuilles responsables du remplissage du grain et participent ainsi à la quasi-totalité du rendement (Thomas *et al.*, 1989 ; Lovell *et al.*, 1997 ; Palmer et Skinner, 2002 ; Duvivier *et al.*, 2015).

Les conidies arrivant sur une nouvelle feuille germent à des températures de minimum 2-3°C et maximum 33-37°C avec une température optimale entre 20-25°C. Un optimum de 8000 à

12000 lux favorisera également leur germination (Eyal *et al.*, 1987). Ce processus de germination débute en moyenne 12 heures après le premier contact à condition que les facteurs environnementaux soient favorables (Ponomarenko *et al.*, 2011). Le processus de pénétration dans les tissus foliaires de l'hôte se déroule de la même façon que pour les ascospores. La seule différence entre les deux, c'est le temps entre l'infection (adhésion, germination et pénétration de la spore) et la formation de pycnides matures accompagnées de nécroses. Ce temps de latence dure en moyenne 14 à 21 jours et sera fortement dépendant de la concentration en biomasse fongique, des conditions environnementales et des propriétés de résistance du cultivar (Eyal *et al.*, 1987 ; Eyal, 1999). Les symptômes sont plus rapidement visibles après une contamination par des pycnidiospores qu'après une contamination par des ascospores. Il s'agit probablement d'une production plus efficace d'hyphes et autres structures envahissantes dans le cas des pycnidiospores et donc d'une production de pycnides plus rapides que chez les ascospores (Morais *et al.*, 2015). La taille de la lésion, la densité des pycnides et autres propriétés des symptômes restent identiques quelle que soit la spore observée (Duvivier *et al.*, 2015). Comme expliqué dans la section précédente, au fur et à mesure que la saison culturale avance, des ascospores commencent également à se former sur les feuilles préalablement infectées par *Z. tritici*. Il s'agit d'un processus similaire menant à la formation de pseudothèces dans la chambre sous-stomatique une fois que deux souches de types sexués opposés se rencontrent. Le champignon a alors entièrement colonisé la plante avec ses deux types de fructification.

Z. tritici adopte donc une double stratégie pour arriver à ses fins. Sur le blé, il se reproduit asexuellement afin d'augmenter en nombre tant que les conditions sont favorables. Une fois que le champignon se sent menacé dû à des conditions environnementales défavorables, des agents compétiteurs, des produits phytosanitaires, etc., il démarre une reproduction sexuée afin de produire des ascospores. Celles-ci lui permettent, d'une part, de survivre sur des débris de culture jusqu'à ce que les conditions redeviennent favorables ou d'être transporté sur de plus longues distances en espérant trouver des meilleures conditions et, d'autre part, de se diversifier génétiquement afin de mettre en place des mécanismes de résistance adaptés qui lui seront bénéfiques dans le futur.

2.2.2.3 Fin de la saison culturale

Après la récolte, le pathogène va être capable de survivre sous différentes formes sur des débris ou autres structures végétales restantes dans les champs. On le retrouve principalement sous forme de périthèce, cependant des recherches ont montré que des pycnides ainsi que du mycélium pouvaient représenter une forme de survie également (Eyal

et al. 1987 ; Suffert et al., 2011 ; Suffert et Sache, 2011). En France, des études menées par Suffert et Sache (2011) ont démontré des pics de production d'ascospores et de pycnidiospores en octobre et novembre. Ceci a également été décrit en Belgique (Duvivier et al., 2015). Ce moment coïncide avec l'émergence de semis de blé. Ceci prouve que les deux types de spores sont impliqués simultanément dans l'infection quand il s'agit des conditions environnementales présentes dans nos régions. Seulement, les ascospores sont dispersées à plus grande échelle par le vent et sont donc plus contraignantes que les conidies car peuvent infecter de nombreuses cultures à la fois. Les pycnidiospores se limitent à une infection locale mais ne sont en aucun cas négligeables (Suffert et Sache, 2011). Une fois novembre - début décembre, le cycle continue et la saison culturale recommence.

2.2.3 Symptômes de la maladie et observations microscopiques

Contrairement à *P. nodorum* qui attaque également les épis, *Z. tritici* n'est visible que sur les feuilles et plus rarement sur les tiges de la plante. Durant le stade initial de la maladie, les premiers signes d'infection sur les feuilles sont caractérisés par des petites lésions chlorotiques, oblongues et irrégulières (Eyal et al., 1987 ; Ponomarenko et al., 2011). Celles-ci s'agrandissent au fur et à mesure que la maladie progresse et se positionnent très souvent parallèlement avec les nervures de la feuille. A l'endroit des chloroses, les tissus finissent par mourir et obtiennent une couleur brune ou noire dans certains cas. Il s'agit désormais de nécroses accompagnées d'une formation de fructifications sexuées et asexuées par le champignon. Ces pseudothèces et/ou pycnides prennent place au niveau des chambres sous-stomatiques et paraissent comme de petits points noirs à la surface des feuilles. Une fois les lésions devenues matures, *Z. tritici* continue sa progression sur l'entièreté de la feuille et les multiples lésions fusionnent jusqu'à la destruction complète de la feuille (Eyal et al., 1987 ; Ponomarenko et al., 2011 ; Gigot, 2013 ; Mehta, 2014).

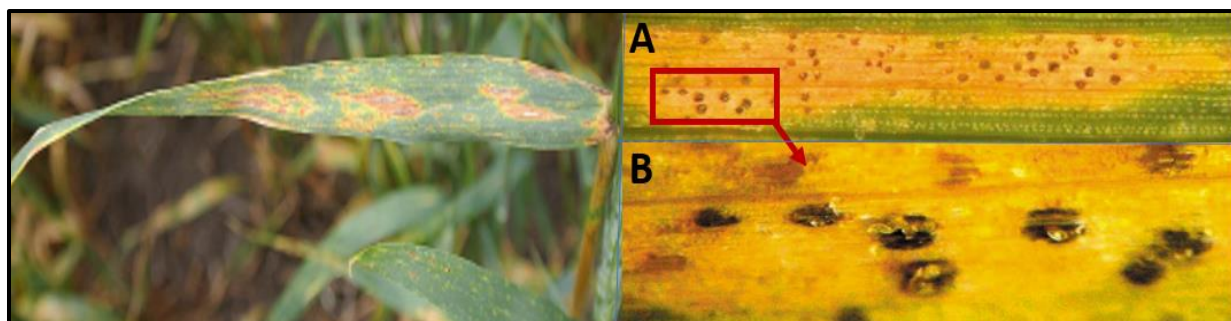


Figure 3 : Les symptômes de la septoriose, causée par l'agent pathogène *Z. tritici*, visibles sur une feuille de blé avec observation d'un ensemble de pycnides présent au sein d'une lésion mature (A) et de la sortie des cirrhes (B) (modifié de McMullen et Adhikari, 2016).

Les deux types de fructifications (pycnides et pseudothèces) semblent assez similaires à l'œil nu. Néanmoins, plusieurs caractéristiques observables au microscope permettent de faire la différence entre celles-ci. La figure 3 illustre une lésion mature typiquement présente sur une feuille de blé. Les pycnides issues de la forme asexuée sont globuleuses à oblongues, de couleur noire et mesurent en moyenne 80-200 μm de diamètre (Shearer et Wilcoxson, 1978). Elles produisent des pycnidiospores pouvant être de deux sortes : soit des macropycnidiospores (35-98 x 1-3 μm) filiformes, hyalines et légèrement courbées possédant 2-7 septations, soit des micropycnidiospores (5-10.5 x 0.3-1 μm) hyalines, courbées et unicellulaires. Les deux formes de conidies sont cependant également capables d'infecter le blé (Eyal *et al.*, 1987 ; Gigot, 2013 ; Mehta, 2014). Les pseudothèces sont globuleux, de couleur noire et mesurent en moyenne 68-114 μm de diamètre. Ils contiennent des asques (30-40 x 11-14 μm), cellules reproductrices des ascomycètes, produisant 8 ascospores par asque. Ces spores sexuées sont hyalines et elliptiques ainsi que caractérisées par une taille de 9-16 x 2.5-4 μm . Chaque ascospore est constituée de 2 cellules de longueur inégale (Ponomarenko *et al.*, 2011 ; Mehta, 2014).

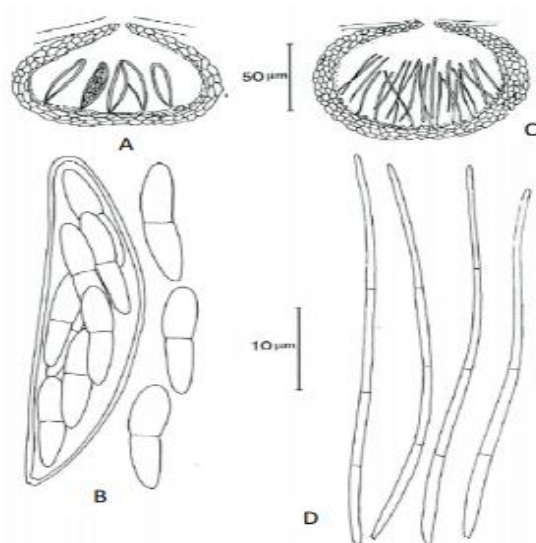


Figure 4 : Les différentes structures de reproduction de l'agent pathogène *Z. tritici*. A gauche, la reproduction sexuée caractérisée par un pseudothèce (A), un asque et des ascospores (B). A droite, la reproduction asexuée caractérisée par une pycnide (C) contenant des pycnidiospores (D) (d'après Morais, 2015).

2.3 Lutte intégrée contre l'agent pathogène *Z. tritici*

La lutte intégrée a été définie par la directive européenne 2009/128/CE comme étant « la prise en considération attentive de toutes les méthodes de protection des plantes disponibles et, par conséquent, l'intégration des mesures appropriées qui découragent le développement des populations d'organismes nuisibles et maintiennent le recours aux produits phytopharmaceutiques et à d'autres types d'interventions à des niveaux justifiés des points de vue économique et environnemental, et réduisent ou limitent au maximum les risques pour la santé humaine et l'environnement. » Cette notion de lutte intégrée englobe dans un seul concept les différentes lutttes appliquées à ce jour contre les ennemis des cultures. Dans ce travail, il est plus essentiel de s'attarder sur deux sortes de lutttes qui sont à ce jour les plus employées et les plus prometteuses par rapport à la septoriose du blé. Il s'agit de la lutte prophylactique et de la lutte chimique.

2.3.1 Lutte prophylactique

2.3.1.1 Le choix variétal et les mélanges de variétés

Nombreuses sont les pratiques culturales permettant de lutter contre la septoriose du blé. Parmi celles-ci, le choix variétal est sans doute la technique la plus efficace à ce jour. Cette pratique consiste à cultiver des variétés tolérantes à la septoriose du blé ce qui permettra d'assurer un bon rendement lorsque le niveau de pression est élevé (Duvivier *et al.*, 2013 ; Robin, 2013 ; Arvalis, 2017 ; Bataille *et al.*, 2017). Chaque année, des organisations/sociétés, telles qu'Arvalis en France et le CRA-W en Belgique sélectionnent les variétés de blé qui semblent les plus résistantes face aux différentes maladies qui ravagent les cultures dans nos régions. Cette résistance ne repose pas uniquement sur la présence de gènes impliqués directement dans la lutte contre l'agent pathogène à la surface de la feuille. Elle intègre aussi tout ce qui concerne la morphologie et l'architecture de la plante qui sont des propriétés également liées à la génétique et qui bloquent, de façon indirecte, la prolifération fongique. Par exemple, les expériences réalisées par Fraaije *et al.* (2002) ont démontré que les variétés à hautes tiges sont moins susceptibles d'être contaminées par les spores que les variétés à courtes tiges. Ceci est principalement lié à une réduction de l'arrivée des spores ce qui permet d'échapper plus facilement à la maladie. Néanmoins, il est important de préciser qu'aucune variété n'est totalement résistante face à la septoriose. De plus, les variétés tolérantes ne sont pas forcément celles offrant le meilleur rendement pour l'agriculteur (Mundt *et al.*, 1995). C'est ici que la notion de 'mélange variétal' prend surface. Depuis des années, de plus en plus d'études (Mundt *et al.*, 1995 ; Mille *et al.*, 2006 ; de Vallavieille-Pope *et al.*, 2006 ; Gigot *et al.*,

2013 ; Gigot *et al.*, 2014) prouvent que les mélanges variétaux offrent une diminution non négligeable du risque de septoriose. Ainsi, Gigot *et al.* (2013) ont démontré qu'une variété sensible mais fortement productive était nettement mieux protégée une fois mélangée à des variétés résistantes que si celle-ci était cultivée seule. De plus, la culture monovariétale, qui fait le plus souvent référence à l'utilisation d'un seul gène de résistance, stimule fortement le pathogène à développer des mécanismes adéquats pour contourner cette résistance. En conséquence, l'assemblage de variétés présentant des gènes de résistance différents face au pathogène pourrait être encore plus efficace pour contrer la maladie (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2006). Pour le nombre de variétés à mélanger, certaines études favorisent des mélanges de 4 variétés (3:1 résistante : susceptible) tandis que d'autres plutôt des mélanges de 2 variétés (1:1 résistante : susceptible) ou encore des associations de 3 à 5 variétés différentes (Mundt *et al.*, 1995 ; de Vallavieille-Pope *et al.*, 2006 ; Gigot *et al.*, 2013).

2.3.1.2 Autres pratiques culturelles

A côté du choix variétal, il existe plusieurs pratiques culturelles essentielles pour lutter contre la prolifération du pathogène.

La date de semis joue un rôle primordial dans l'infection primaire de la maladie. Nous avons vu auparavant que les ascospores sont transportées par le vent dès le début de l'automne avec un pic de production de ces spores en octobre - novembre. Si le semis est trop précoce, la plantule arrivera rapidement à un stade végétatif avancé au moment exact où l'infection par *Z. tritici* est la plus probable. Le blé sera donc plus susceptible d'être contaminée par *Z. tritici* (Suffert *et al.*, 2011 ; Duvivier *et al.*, 2013 ; Robin, 2013). La densité de semis est un autre facteur pouvant influencer l'évolution de l'épidémie. En effet, nous avons vu que la dispersion des spores sexuées ou asexuées se faisait via plusieurs mécanismes. Une densité trop élevée favorisera le transfert d'inoculum entre les différentes plantes de la parcelle par contact entre les feuilles. De plus, une densité plus importante provoque la formation d'un microclimat plus humide dans la végétation qui sera favorable au développement de la maladie. Il est donc essentiel de ne pas semer trop dense (Eyal *et al.*, 1987 ; Ansar *et al.*, 2010 ; Suffert *et al.*, 2011). Enfin, d'autres pratiques comme la rotation des cultures, la suppression des repousses et des hôtes alternatifs ainsi que l'enfouissement des résidus de culture dans les sols sont à respecter afin de minimiser le plus possible le développement de la maladie (Eyal *et al.*, 1987 ; Suffert *et al.*, 2011 ; Robin, 2013).

2.3.2 Lutte chimique

2.3.2.1 Applications des traitements

En Wallonie, le blé est la cible de nombreux champignons phytopathogènes à l'origine d'une multitude de maladies dont les plus fréquentes à ce jour sont la septoriose, la rouille (jaune et brune) et la fusariose des épis. En évaluant les périodes d'infection des principales maladies, cinq stades de croissance du blé sembleraient jouer un rôle essentiel dans la lutte contre ces diverses maladies car il s'agirait de stades clés de la protection fongicide du blé (cf. figure 5) (Bataille *et al.*, 2018).

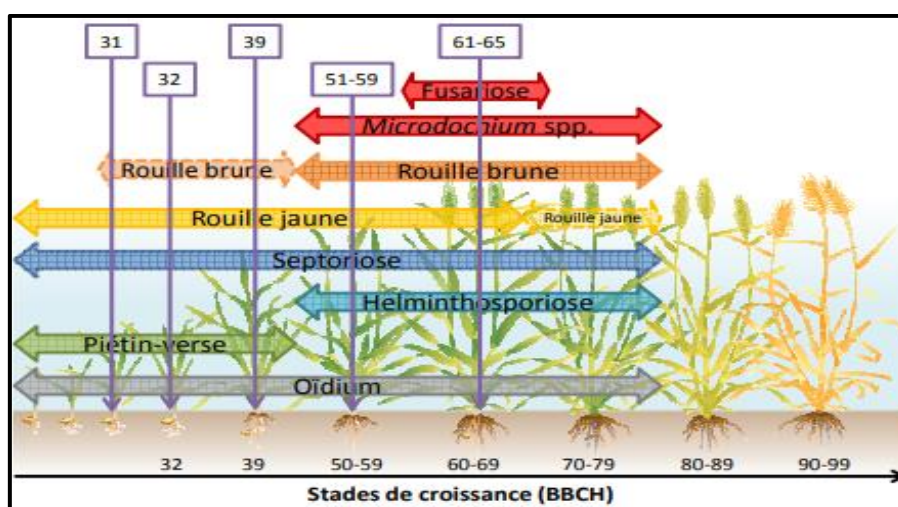


Figure 5 : Représentation des périodes d'infection des huit principales maladies en blé (flèches horizontales) et des cinq stades de croissance clé de la protection fongicide en blé (flèches verticales). Les stades de croissance sont évalués sur une échelle BBCH (d'après Bataille *et al.*, 2018).

Ainsi, plusieurs schémas de traitement fongicide ont été établis sur base de ces stades clés dans le but final d'avoir un remplissage optimal des grains, c'est-à-dire de protéger un maximum les deux dernières feuilles et l'épi de la plante. L'emploi d'un certain schéma de traitement vis-à-vis d'un autre dépendra de plusieurs facteurs tels que les conditions climatiques de la région, la sévérité de la maladie, la variété végétale employée, etc. Ainsi, si la variété est sensible et/ou si les conditions climatiques favorisent l'infection précoce et la propagation accrue de la maladie, il sera fortement conseillé d'employer un schéma de traitement avec un plus grand nombre de traitement (ex. GS31-32-39-65, GS32-39-65, etc.). Il s'agit cependant de programmes fongicides plus coûteux. Dans le cas inverse, notamment si la variété de blé est plus résistante et/ou lorsque les conditions climatiques induisent une faible pression des principales maladies, il sera conseillé d'adopter un schéma de traitement avec seulement une ou deux applications fongicides (ex. GS32-39, GS39, GS55, etc.). Ceci s'accompagnera évidemment d'une baisse des coûts pour l'agriculteur (cf. figure 6) (Bataille *et al.*, 2018).

1 ^{er} traitement	Schéma de traitement (abréviation)	1 ^{er} nœud Stade 31	2 ^{ème} nœud Stade 32	Dernière feuille Stade 39	Epiaison Stade 55	Floraison Stade 65
Avant ou au 2 ^{ème} nœud	st31//st32//st55	x	x		x	
	st31//st32//st39//st65	x	x	x		x
	st32//st55		x		x	
	st32//st39		x	x		
	st32//st39//st65		x	x		x
Après le 2 ^{ème} nœud	st39			x		
	st55				x	
	st65					x
	st39//st65			x		x
0 traitement						

Figure 6 : Les différents schémas de traitement fongicide mis en place pour lutter contre les principales maladies présentes dans nos cultures de blé en 2018. Les schémas de traitement non grisés n'ont pas été testés en Wallonie en 2017 durant les essais fongicides (d'après Bataille *et al.*, 2018).

Ainsi, ces différents schémas de traitement ont été mis en place afin de contrôler au mieux les diverses maladies présentes dans nos cultures tout en s'adaptant à n'importe quelle situation climatique, épidémiologique, financière et culturale. L'application fongicide à un certain stade a un rôle bien précis. Par exemple, le traitement au stade deux nœuds (GS32) consiste à éviter l'avancement de la maladie lorsqu'elle se trouve encore sur les étages foliaires bas. Le traitement au stade de croissance dernière feuille étalée (GS39) consiste à pulvériser les feuilles F1, F2, F3 et F4 afin de rompre à nouveau le cycle infectieux de nombreux champignons dont celui de *Z. tritici*. Enfin, le traitement au stade de floraison (GS65) va être essentiel pour protéger l'épi de la fusariose. Ce traitement est cependant souvent trop tardif pour pouvoir lutter contre la septoriose. Aujourd'hui, on peut distinguer deux catégories de programmes fongicides : les programmes avec un premier traitement avant le stade dernière feuille étalée (GS39) ayant pour but d'empêcher et de stopper la progression de la maladie en plus de maintenir durablement la maladie sur la plante et les programmes débutant à partir du stade dernière feuille étalée ayant uniquement pour but de maintenir durablement la maladie sur la plante (cf. figure 6) (Robin, 2013 ; Arvalis, 2017 ; Bataille *et al.*, 2018)

En Belgique et en France, il est conseillé de retarder le premier traitement jusqu'au stade GS39 lorsque c'est possible. En effet, selon des études réalisées par différents instituts et centres pilotes comme par exemple le CARAH, le CPL-VEGEMAR ou le CRA-W en Belgique et Arvalis en France, un unique traitement appliqué au stade dernière feuille étalée, est le plus important en rapport qualité/prix. Ainsi, il a été démontré que l'application de ce seul traitement avec un produit approprié sur une variété sensible (ex. Trapez) serait même plus rentable en rapport qualité/prix que les stratégies en deux traitements sur cette même variété. Il est donc essentiel d'être au courant des nouveautés sur les résistances variétales, le développement des substances actives et les techniques de positionnement des fongicides afin de pouvoir

lutter efficacement contre la maladie tout en optimisant son rendement final. Evidemment, l'application des traitements doit être effectuée en suivant les avis proposés par les différents organismes de références agricoles tels qu'Arvalis et le CRA-W. En plus de ces avis, des outils de décision, comme Septo-LIS en France ou Proculture en Belgique, permettent d'analyser toutes les données climatiques, variétales, etc., en temps réel afin de prévenir l'agriculteur à quel moment et à quel endroit il doit appliquer un schéma de traitement bien précis sur sa culture de blé (Moreau et Maraite, 2000 ; Gouache, 2010 ; Robin, 2013 ; Arvalis 2017 ; Bataille *et al.*, 2018).

2.3.2.2 Substances actives

A côté des nombreuses modalités employées pour lutter contre la septoriose, il est important d'aborder l'aspect moléculaire de ces différentes substances actives que l'on pulvérise chaque année sur nos champs de blé.

Les fongicides sont le plus souvent divisés en deux catégories : les produits de contact et les produits systémiques (Rocher, 2004). La première catégorie inclut les produits à action multisite qui sont à appliquer préventivement. Typiquement, on les dénomme 'inhibiteurs multisites' dû à leurs multiples actions inhibitrices. En effet, ceux-ci vont agir sur multiples voies biochimiques à la fois afin d'induire un stress métabolique à plusieurs niveaux au sein du champignon. Les fongicides systémiques agissent sur des voies biochimiques précises et sont de ce fait plus spécifiques. En outre, ils ont aussi une action curative. Cette spécificité envers une certaine cible s'accompagne très souvent d'une spécificité envers une série de pathogènes en particulier. Ainsi, le produit sera nettement plus efficace et une dose inférieure sera nécessaire pour permettre un contrôle adéquat du pathogène ciblé. En revanche, le développement d'une résistance face à un produit phytosanitaire est favorisé lorsqu'il s'agit d'un fongicide à action unisite car le champignon ne doit que défendre un site étant donné qu'un seul mode d'action entre en jeu face à celui-ci. Un fongicide à action multisite quant à lui ne laisse pas le temps au champignon de développer des mécanismes de résistance adéquats car plusieurs niveaux cellulaires sont touchés en même temps.

Aujourd'hui, la majorité des substances employées contre la septoriose font partie de cette deuxième catégorie. Parmi celles-ci, on retrouve les Methyl Benzimidazole Carbamates (MBCs), les Quinone outside Inhibitors (QoIs), les Sterol Demethylation Inhibitors (DMIs) et les Succinate DeHydrogenase Inhibitors (SDHIs) (Leroux *et al.*, 2007 ; Fraaije *et al.*, 2007 ; Fraaije *et al.*, 2012). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous attarderons sur les triazoles, des molécules de la famille des DMIs. Néanmoins, un arrière-plan historique des autres classes de fongicides permet de mieux comprendre les associations réalisées entre substances actives.

Inhibiteurs multisites

Il s'agit de la plus vieille famille de substances actives employée pour lutter contre les champignons et notamment la septoriose du blé. Comme son nom l'indique, cette famille est constituée de composés chimiques ayant des actions inhibitrices sur plusieurs sites c'est-à-dire sur plusieurs voies enzymatiques. Dans le cas de la septoriose, on parle d'une activité préventive qui correspond à une inhibition de la germination des spores (Leroux *et al.*, 2007 ; Fraaije *et al.*, 2007). Parmi ces composés, les plus connus sont le chlorothalonil, le folpel, le mancozèbe et le soufre. Leur utilisation reste primordiale à ce jour avec une efficacité plus accentuée de ceux-ci une fois associés à un triazole lors du traitement au stade 39 de la plante. Leur rôle essentiel est de limiter la sélection de souches MDR (Multi Drug Resistant) dont les propriétés seront expliquées par la suite (Leroux *et al.*, 2007 ; Gagliardi *et al.*, 2017 ; Note Commune INRA-ARVALIS-ANSES, 2018).

Methyl Benzimidazole Carbamates (MBCs)

Introduit au début des années '70, ces dérivés de benzimidazole, comme le thiophanate-méthyl, sont les premiers fongicides systémiques à avoir été employés pour lutter contre la septoriose du blé. Leur action unisite consiste à stopper la croissance des hyphes du champignon en se liant à la β -tubuline, la sous-unité β d'une protéine assurant la liaison entre microtubules afin de permettre la division nucléaire dans la cellule fongique. Malheureusement, l'activité de ces substances a très vite été contournée par *Z. tritici* (Leroux *et al.*, 2007 ; Regnault-Roger, 2014).

En effet, il n'a fallu que quelques années d'utilisation pour que la première résistance fasse son apparition. Cette résistance est liée à une mutation ponctuelle (E198A) dans le gène codant pour la β -tubuline entraînant la substitution d'un acide glutamique (E) par un résidu alanine (A) en position 198. Aujourd'hui, les MBCs ne sont plus employés dans les programmes de traitement chimique de la septoriose car la mutation se retrouve parmi toutes les populations de *Z. tritici* (Leroux *et al.*, 2007 ; Fraaije *et al.*, 2007 ; Hawkins et Fraaije, 2016).

Quinone outside Inhibitors (QoIs) (famille des strobilurines)

Apparues à la fin des années '90, les strobilurines semblaient être la solution idéale dans le combat contre la septoriose du blé. Parmi cette famille, on retrouve une large gamme de composés comme l'azoxystrobine, le pyraclostrobine, le trifloxystrobine, le dimoxystrobine et le fluoxystrobine. Ces derniers sont classés dans le groupe des fongicides QoIs dû à leur action de liaison spécifique sur le complexe mitochondriale bc1 (complexe III), plus précisément au niveau du site Qo (quinol oxydation site). Ainsi, ils inhibent la respiration en bloquant le

transfert d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le champignon finit par mourir dû à un manque d'énergie (Gisi *et al.*, 2002 ; Leroux *et al.*, 2007 ; Duvivier *et al.*, 2013). Comme pour les MBCs, il n'a fallu que quelques années avant d'apercevoir les premiers cas de résistance au sein de différentes espèces de champignons. Cette résistance, observée chez *Z. tritici* pour la première fois en 2001 au Royaume-Uni, est principalement associée à une mutation ponctuelle dans le gène codant pour le cytochrome b résultant ainsi à la substitution d'une glycine (G) par un résidu alanine (A) en position 143 (G143A) (Gisi *et al.*, 2002 ; Fraaije *et al.*, 2005 ; Torriani *et al.*, 2009). Lors des saisons suivantes, des isolats résistants ont pu être isolés dans de nombreux pays européens avec une présence plus importante au nord de l'Europe où la pression de la maladie serait plus forte en raison des conditions climatiques (Fraaije *et al.*, 2005 ; Leroux *et al.*, 2007 ; Torriani *et al.*, 2009). En Belgique, les premières souches résistantes ont été détectées en 2002-2003 (Amand *et al.*, 2003). Selon Gisi *et al.* (2002), cette invasion surprenante serait principalement due, d'une part, à des événements de mutation plus fréquents sachant qu'il s'agit d'un ADN mitochondrial et, d'autre part, à une transversion puissante dans le gène cible n'affectant en aucun cas l'activité de l'enzyme. Ceci amène à la naissance de mutants totalement résistants face aux fongicides Qols. Déjà en 2006, des expériences menées par Fraaije *et al.* (2007) ont démontré une présence de la mutation G143A dans 96% des isolats étudiés et donc une efficacité restreinte de l'azoxystrobine.

Aujourd'hui, l'efficacité des strobilurines semble être toujours aussi réduite face à la maladie. En effet, cette même résistance a envahi l'entièreté de nos régions menant à une utilisation limitée des fongicides Qols dans les programmes de traitement contre la septoriose (Gagliardi *et al.*, 2017 ; Note Commune INRA-ARVALIS-ANSES, 2018).

Sterol Demethylation Inhibitors (DMIs)

Avec l'apparition rapide des résistances face aux MBCs et aux Qols, les DMIs sont, depuis les années '80, majoritairement utilisés dans les programmes de traitement chimique contre la septoriose (Duvivier *et al.*, 2013). Parmi cette famille, les substances les plus actives font partie de la classe des azoles dans laquelle on retrouve entre autres les dérivés de triazole (cyproconazole, époxiconazole, tébuconazole, metconazole, etc.), les imidazoles (prochloraze) et un dérivé de triazolinthione, le prothioconazole introduit plus tardivement que les autres substances (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). Pour des raisons de facilité, le terme 'triazole' sera employé tout au long du travail pour faire référence au prothioconazole également. Il s'agit de la classe d'agents antifongiques la plus employée contre les champignons pathogènes végétaux et humains (Cools *et al.*, 2013). Les DMIs, également appelés SBIs (sterol biosynthesis inhibitors), sont des inhibiteurs de la biosynthèse

des stérols. Leur action unisite inhibe la synthèse de l'ergostérol, un composant de la membrane des cellules fongiques ayant la même fonction que le cholestérol chez les humains, en se fixant spécifiquement à l'enzyme 14 α -déméthylase (cytochrome P450) du gène CYP51, impliquée dans cette voie métabolique (Leroux et Walker, 2011 ; Parker *et al.*, 2011 ; Regnault-Roger, 2014). Contrairement aux MBCs et aux Qols, également des fongicides à action unisite, le contrôle de la maladie via les DMIs échoue rarement. Néanmoins, depuis quelques années la sensibilité aux azoles devient de plus en plus récurrente à travers les populations de *Z. tritici* (Cools *et al.*, 2012 ; Cools *et al.*, 2013). Les mécanismes de résistance, complexes et nombreux, seront éclaircis par la suite.

Les carboxamides (SDHIs, Succinate Dehydrogenase Inhibitors)

L'ascension de multiples résistances face aux azoles a stimulé la recherche en vue de mettre une nouvelle classe de fongicides sur le marché, les carboxamides. En réalité, ils appartiennent à une vieille classe de fongicides datant des années '60 qui a été retravaillée et modifiée afin de donner une nouvelle génération de substances plus efficaces (Fraaije *et al.*, 2012 ; Kirikyali *et al.*, 2017). Contrairement à l'ancienne génération, les nouveaux carboxamides ont un spectre d'activité plus large et leur action curative, notamment sur *Z. tritici*, offre des résultats convaincants. On retrouve parmi ceux-ci une grosse sélection de substances avec comme premier représentant le boscalid, introduit à partir de 2003, ainsi que le fluxapyroxad, le bixafen et l'isopyrazam introduits quelques années après (Walker, 2011 ; Fraaije *et al.*, 2012 ; Yamashita et Fraaije, 2018 ; Bataille *et al.*, 2018). Les carboxamides sont également appelés Succinate DeHydrogenase Inhibitors (SDHIs) en raison de leur action unisite et inhibitrice sur la succinate déshydrogénase, une enzyme appartenant au complexe II de la chaîne respiratoire. En se liant au site de liaison quinone de l'enzyme, les SDHI bloquent le transport d'électrons et finalement la production d'énergie (Fraaije *et al.*, 2012 ; Yamashita et Fraaije, 2018 ; Bataille *et al.*, 2018). Depuis 2012, une succession de mutations chez *Z. tritici* a pu être observée dans les sous-unités B, C et D de SDH. Comme pour les autres fongicides systémiques décrits ci-dessus, il s'agit de mutations ponctuelles dans le gène cible codant dans ce cas pour l'enzyme SDH. Parmi celles-ci, la mutation C-H152R, découverte pour la première fois au Royaume-Uni en 2015, confère la plus haute résistance face aux nouveaux produits. Les autres mutations, dont C-T79N (France, 2012), C-W80S (Royaume-Uni, 2012), C-N86S (Allemagne, 2013), etc., traduisent des facteurs de résistance faibles à moyens face aux SDHI (Dooley *et al.*, 2016 ; Kirikyali *et al.*, 2017 ; Rehfus *et al.*, 2017 ; Yamashita et Fraaije, 2018). Aujourd'hui, le nombre de souches résistantes ne fait qu'augmenter à travers les populations européennes de *Z. tritici*. Les programmes de traitement chimique contre la septoriose incitent les

consommateurs à restreindre le plus possible l'utilisation des SDHI et de les combiner avec des triazoles ou des fongicides multisites. Ceci permet de limiter l'évolution génétique du champignon et de faire durer l'efficacité des fongicides actuels.

2.4 Evolution de la résistance de *Z. tritici* face aux DMIs

La notion de résistance est très fréquemment employée dans le domaine de la phytopathologie pour expliquer la relation qui s'installe entre le fongicide et le champignon. Il est donc essentiel de définir cette notion pour comprendre les différents aspects décrits par la suite. Selon la FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), la résistance est définie comme étant « la réduction héréditaire et acquise de la sensibilité d'un champignon à un agent antifongique spécifique ». Cette réduction de sensibilité peut être induite via diverses méthodes dont les changements génétiques, tels que des mutations ponctuelles dans le gène cible, sont les plus observés à ce jour. Une vue plus détaillée sera donnée par la suite.

2.4.1 Mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance

Contrairement à d'autres familles de fongicides à action unisite telles que les MBCs et les QoIs, où une seule mutation peut induire une résistance totale chez la souche, la résistance face aux fongicides azolés est considérée comme un caractère polygénique car elle se base sur une association de multiples mécanismes à la fois. La combinaison de ceux-ci déterminera le niveau de résistance de la souche et contribuera ainsi au phénotype final (Fraaije *et al.*, 2007 ; Cools *et al.*, 2013 ; Cools *et al.*, 2013 ; Wieczorek *et al.*, 2015). Trois mécanismes de résistance sont connus dans la résistance de *Z. tritici* contre les DMIs. (1) Des mutations ponctuelles dans le gène CYP51 codant pour l'enzyme cible 14 α -déméthylase. Cette dernière subira des altérations c'est-à-dire la modification d'un ou plusieurs acides nucléiques pouvant entraîner une modification dans la séquence d'acides aminés suivie à son tour d'un changement dans la conformation d'une protéine. En conséquence, la nouvelle conformation de cette protéine peut par exemple rendre le site d'action du fongicide inaccessible ou inactivable conduisant à une perte d'efficacité du produit phytosanitaire employé. (2) Un efflux important des DMIs hors de la cellule grâce à la surexpression de gènes codant pour les transporteurs membranaires tels que les ABC (ATP Binding-Cassette) ou les MFS (Major Facilitator Superfamily). Ce phénomène résulte en une réduction intracellulaire de la concentration du fongicide qui se traduit ensuite par une perte d'efficacité de celui-ci. Dans le cas de la septoriose, le promoteur MFS1, une fois surexprimé, semble jouer un rôle essentiel dans ce mécanisme de résistance car induit la surproduction d'une série de transporteurs de la famille des MFS. (3) Une surexpression du gène CYP51 entraînant des taux élevés de l'enzyme cible

14 α -déméthylase et donc la nécessité d'une plus grande dose de fongicide pour atteindre un même niveau d'efficacité car plus de sites sont à cibler. Ceci est principalement dû à des modifications au niveau du promoteur du gène CYP51 (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011 ; Omrane *et al.*, 2012 ; Cools *et al.*, 2013 ; Lucas *et al.*, 2015 ; Omrane *et al.*, 2017).

Le premier mécanisme est prépondérant au sein des champignons pathogènes humains et végétaux et contribue majoritairement à la perte d'efficacité des fongicides azolés (Cools *et al.*, 2013 ; Wieczorek *et al.*, 2015). Dans ce travail, une vue détaillée des mutations et génotypes importants, concernant le pathogène étudié *Z. tritici*, sera donnée par la suite accompagnée d'une description des différentes combinaisons possibles entre ces mutations permettant d'identifier plusieurs classes de phénotypes de résistance au sein du champignon phytopathogène.

De manière générale, un grand nombre de mutations dans le gène CYP51 ont pu être détectées à travers ces différents pathogènes humains et végétaux et ont été décrites dans la littérature. (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). Dans certains cas, des mêmes mutations sont retrouvées aussi bien chez un pathogène humain que chez un pathogène végétal (ex. Y136F chez *H. capsulatum* (pathogène humain) et *E. necator* (pathogène végétal)). Dans d'autres cas, la mutation n'est retrouvée que chez une seule espèce ou un seul genre (ex. I381V chez *Z. tritici*). De plus, les différentes mutations offrent parfois des effets contrastés (Becher et Wirsal, 2012 ; Cools *et al.*, 2013 ; Wieczorek *et al.*, 2015). Les expériences réalisées par Leroux *et al.* (2007) montrent ainsi que les isolats de *Z. tritici* portant la substitution I381V sont moins sensibles à la plupart des triazoles, comme le tébuconazole, mais restent cependant sensibles au prochloraze, un imidazole, tandis que des isolats de *Z. tritici* ayant la substitution V136A sont moins sensibles au prochloraze mais sensibles au tébuconazole. Ces deux substitutions semblent avoir des effets assez contradictoires au sein du champignon. Ainsi, il est primordial de connaître l'impact de ces mutations ainsi que leurs proportions dans les populations de *Z. tritici* afin de pouvoir adapter les stratégies de contrôle de la maladie. Dans le cas expliqué ci-dessus, l'utilisation de tébuconazole et de prochloraze en alternance ou en combinaison a permis de lutter contre les deux types d'isolats. Malgré cette stratégie, l'accumulation séquentielle de mutations au sein du gène CYP51 a induit la naissance d'isolats portant les deux mutations à la fois, et par conséquent, rendant ceux-ci résistants face à une plus grande gamme de DMIs que les isolats ne portant qu'une des deux mutations (Leroux et Walker, 2011 ; Cools *et al.*, 2013).

La diversité des génotypes de *Z. tritici* ne fait qu'augmenter en nombre depuis quelques années avec une accumulation plus récurrente des diverses mutations au sein du gène CYP51.

Il semblerait cependant que le matériel génétique du champignon soit dans l'obligation de suivre des lois précises si ce dernier souhaite survivre et se reproduire par la suite et donc que l'apparition de nouveaux génotypes ne se ferait pas au hasard comme on pourrait le croire. Par exemple, il est entièrement possible d'envisager la découverte d'isolats portant uniquement la mutation I381V ou la mutation V136A au sein de leur gène CYP51, cependant ce n'est pas le cas car ces deux types de génotype induisent une perte d'activité de l'enzyme 14 α -déméthylase et donc la mort du champignon. Par contre, une fois une des deux mutations associée à une altération quelconque en position Y459, G460 ou Y461, la protéine ne perd pas son activité et le champignon démontre une certaine résistance face aux DMIs. Les mécanismes à l'origine de ce phénomène sont encore à éclaircir à ce jour mais il est essentiel de comprendre que le champignon ne choisit pas forcément le chemin qu'il souhaite pour arriver à ses fins. Il est ainsi parfois obligé de développer une mutation en vue de pouvoir développer une autre mutation viable (Leroux et Walker, 2011 ; Cools *et al.*, 2012 ; Cools *et al.*, 2013).

2.4.2 Evolution des triazoles dans la lutte contre *Z. tritici*

Les triazoles, substances actives issues de la famille des DMIs, sont fortement employés depuis les années '70 pour lutter contre multiples maladies fongiques. Depuis l'apparition de la résistance totale face aux strobilurines en 2001, les DMIs occupent un rôle indispensable dans la lutte contre la septoriose du blé (Fraaije *et al.*, 2007 ; Leroux *et al.*, 2007 ; Wieczorek *et al.*, 2015). Aujourd'hui, la résistance aux fongicides azolés est associée à des niveaux faibles à moyens dans les populations de *Z. tritici*. De plus, la résistance croisée entre les différents membres de la famille des DMIs reste incomplète. Il est donc possible de garder le contrôle sur la maladie en appliquant des substances issues de la même classe chimique mais démontrant des activités plus fortes (Cools *et al.*, 2013). Malgré ceci, l'utilisation importante de ces produits a mené à une sensibilité moindre au sein des populations européennes de *Z. tritici* (Wieczorek *et al.*, 2015). En observant les valeurs d'EC₅₀, c'est-à-dire la concentration efficace médiane traduisant la concentration de fongicide nécessaire pour inhiber de 50% la croissance du champignon, et en examinant les performances des fongicides directement sur le terrain, il est entièrement possible de tirer une conclusion fiable sur l'efficacité d'un certain produit contre un agent pathogène. Ces deux facteurs sont étudiés depuis des décennies à travers les différentes régions du globe et sur différentes substances actives à la fois afin de pouvoir suivre l'évolution de la résistance face aux divers membres de la famille des DMIs (Fraaije *et al.*, 2007 ; Wiecezorek *et al.*, 2015). De cette façon, Gisi *et al.* (1997) démontra que le cyproconazole, un des premiers triazoles employé contre la septoriose, n'affiche aucune

différence d'activité entre 1992 et 1996 sur la croissance d'une multitude de souches issues de France, d'Allemagne, d'Angleterre et de Suisse. En revanche, quelques années après seulement, d'autres recherches dont celles réalisées par Clark (2006) et Fraaije *et al.* (2007) ont su démontrer la perte d'activité de certains triazoles, notamment le tébuconazole, le propiconazole et le cyproconazole. Le tébuconazole est sûrement un des triazoles ayant perdu le plus d'efficacité depuis son utilisation contre *Z. tritici*. En effet, l'efficacité au champ du triazole à travers l'Europe serait passée d'environ 70-80% entre 1994-2004 à environ 40% entre 2014-2015 (Strobel *et al.*, 2017). Comme visible sur la figure 7, les recherches de Fraaije *et al.* (2007) décrivent un shift significatif de l'efficacité du tébuconazole en 2003-2004, observé suite à des tests *in vitro* de la sensibilité de *Z. tritici* face à celui-ci. On remarque également un shift de la sensibilité des souches de *Z. tritici* concernant l'époxiconazole, cependant moins prononcé que dans le cas du tébuconazole. (Fraaije *et al.*, 2007 ; Wieczorek *et al.*, 2015).

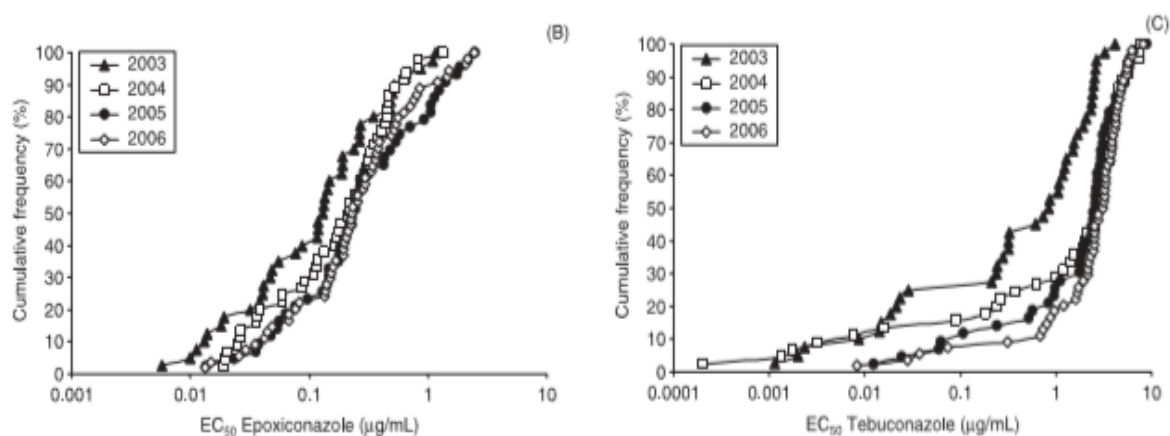


Figure 7 : Sensibilité des souches de *Z. tritici* de Rothamsted au tébuconazole et à l'époxiconazole entre 2003 et 2006 avec regroupement des souches en fonction de l'augmentation des valeurs d'EC₅₀ (modifié de Fraaije *et al.*, 2007).

En Belgique, des résultats similaires concernant l'époxiconazole ont pu être observés entre 2002 et 2009. Ceux-ci se portent sur un grand nombre de souches comme illustré sur la figure 8 (Clinckemaillie, donnée non publiée).

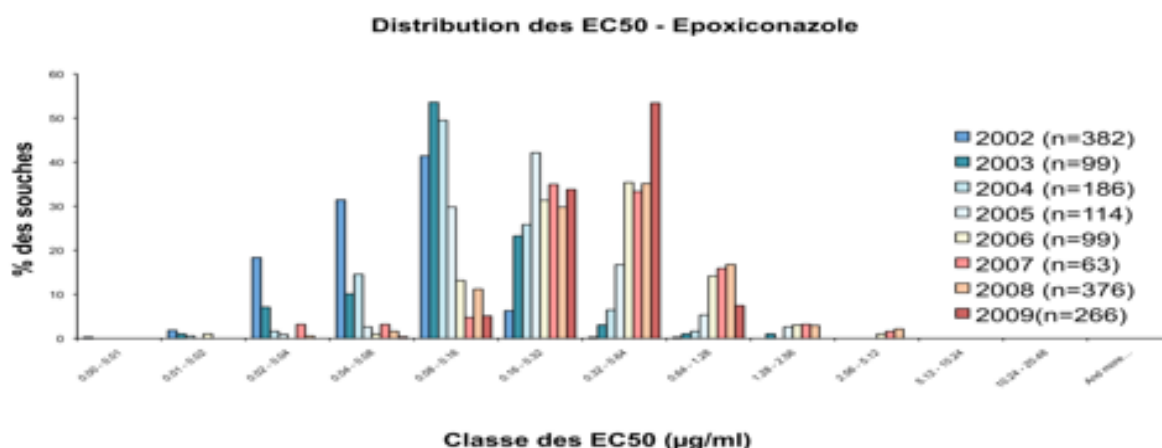


Figure 8 : Sensibilité des souches de *Z. tritici* de Belgique à l'époxiconazole entre 2002 et 2009 avec regroupement du nombre de souches (%) en fonction de leur classe d'EC₅₀ (µg/ml). Chaque couleur correspond à une année spécifique où n souches ont été étudiées (d'après Clinckemaillie, donnée non publiée).

Depuis quelques années, ce sont l'époxiconazole et le prothioconazole qui offrent les meilleures performances à travers l'Europe en ce qui concerne les triazoles (Heick *et al.*, 2017 ; Strobel *et al.*, 2017). Malgré une perte d'efficacité, le tébuconazole et le metconazole restent cependant efficace dans certaines régions là où le prothioconazole et l'époxiconazole le sont moins (Strobel *et al.*, 2017 ; Note Commune INRA-ARVALIS-ANSES, 2018). Pour l'époxiconazole et le prothioconazole, aucun changement de la sensibilité n'a été rapporté avant 2003-2004. Depuis, une activité réduite des composés a pu être démontrée par de nombreux chercheurs (Fraaije *et al.*, 2007 ; Stammler et Semar, 2011 ; Strobel *et al.*, 2017). Cette diminution serait principalement dû à l'émergence de nouveaux variants de la protéine CYP51.

Néanmoins, ces principaux triazoles (metconazole, tébuconazole, prothioconazole et époxiconazole) gardent tout de même des performances importantes dans de nombreuses régions en Europe surtout lorsqu'on les associe entre eux ou à un SDHI tel que le fluxapyroxad (Stammler et Semar, 2011 ; Cools *et al.*, 2012 ; Wieczorek *et al.*, 2015 ; Heick *et al.*, 2017). Les recherches réalisées par Jorgensen *et al.* (2018) confirment cette hausse d'efficacité de ces triazoles une fois qu'ils sont mélangés entre eux. En effet, l'étude a évalué, sur deux années consécutives (2015 et 2016), l'augmentation du rendement en blé à travers dix pays européens et il s'avère qu'un mélange entre deux triazoles augmenterait le rendement jusqu'à 15-20% tandis que l'application d'un seul triazole augmenterait le rendement d'environ 10% en 2016 quel que soit le triazole utilisé. Ainsi, malgré une perte d'efficacité de chaque triazole au fil des années, l'association de ceux-ci entre eux et/ou avec d'autres familles de fongicides semble rester une solution encourageante pour lutter contre la septoriose.

2.4.3 Mutations associées aux résistances : relation phénotype - génotype

Comme expliqué préalablement, la cause principale de la réduction de sensibilité de *Z. tritici* face aux divers triazoles est l'apparition progressive de mutations ponctuelles dans le gène CYP51. Aujourd'hui, de nombreuses recherches, comme celles réalisées par Cools *et al.* (2012, 2013), ont révélé l'existence de combinaisons précises entre ces différentes mutations. Ces combinaisons offrent des performances intéressantes auprès du champignon et sont clairement contraignantes dans la lutte contre la septoriose. Ainsi, selon le comportement de l'agent pathogène face à différentes substances de la classe des DMIs (niveau de résistance) et selon l'association des altérations dans son génome (CYP51), des classes de phénotypes ont pu être associées à tous les types d'isolats retrouvés à travers les populations de *Z. tritici*. On parle de la relation phénotype - génotype d'une souche de *Z. tritici*. Il est à noter que les deux autres mécanismes de résistance majeurs décrits précédemment (cf. section 2.4.1.) jouent également un rôle essentiel dans la réduction de sensibilité de *Z. tritici* face aux fongicides azolés (Cools *et al.*, 2012).

2.4.3.1 Les phénotypes de résistance

Jusqu'à aujourd'hui, une multitude de phénotypes résistants aux DMIs ont été identifiés et possèdent des phénotypes (TriR) différents du phénotype de type sensible/sauvage (TriS). Ceux-ci sont répartis selon leur niveau de résistance en trois classes phénotypiques principales : les phénotypes résistants avec des niveaux de résistance faibles (TriLR), modérés (TriMR) et élevés (TriHR) face aux différentes substances azolés. Dans chaque classe principale on peut alors distinguer plusieurs phénotypes résistants qui se différencient les uns des autres grâce à des gammes de facteurs de résistance par rapport aux divers DMIs. Un facteur de résistance est un outil de comparaison permettant de définir le profil de résistance d'une souche vis-à-vis d'un fongicide spécifique sur base de différents calculs possibles comme par exemple le calcul suivant : EC_{50} de la souche étudiée / EC_{50} de la souche sensible. En suivant cette même démarche pour un grand nombre de composés antifongiques, on obtient plusieurs facteurs de résistance, c'est-à-dire une gamme de facteurs de résistance, qui permettront de définir le profil de résistance de la souche étudiée par rapport à la gamme de composés testée. Ensuite, sur base des résultats obtenus pour une grande quantité de souches, on pourra répartir les souches démontrant des gammes de facteurs de résistance semblables dans des classes identiques qu'on appelle finalement phénotype (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). De cette façon, plusieurs gammes de facteurs de résistance sont créées afin de pouvoir inclure toute la diversité phénotypique du champignon. Finalement, la caractérisation moléculaire des souches, dont les valeurs d' EC_{50} ont

préalablement été déterminées, permet d'associer une combinaison d'altérations à un phénotype de résistance bien précis. En effet, la combinaison de mutations au sein du gène CYP51 d'une souche lui permettra d'acquérir multiples mécanismes de résistance face à divers DMI dont un lien cohérent peut être établi avec la gamme de facteurs de résistance de la même souche par rapport à ces mêmes DMI. Cet outil de comparaison nous permet de distinguer une population de *Z. tritici* par rapport à une autre sur un point phénotypique et génotypique à la fois. Selon le pays, la nomenclature employée pour définir les diverses classes phénotypiques peut changer. La même nomenclature que celle employée par les chercheurs français sera reprise dans ce travail, notamment TriS (sauvage) et TriR (résistance) (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011 ; Cools *et al.*, 2013 ; Wieczorek *et al.*, 2015).

Fongicide	EC ₅₀ (mg L ⁻¹) ^a TriS	Resistance factors (RFs) ^b														
		TriR1	TriR2	TriR3	TriR4	TriR5	TriR5+	TriR6	TriR7	TriR8	TriR8+	TriR9	TriR11a	MDR-6	MDR-7	MDR-10a
Pyrifénox	0.0013	2.7	6.9	10.0	23.1	27.7	126.9	36.2	30.8	40.0	123.1	192.3	153.8	192.3	246.2	230.8
Prochloraz	0.0018	2.7	3.9	9.4	6.7	15.0	27.8	6.7	1.5	0.8	2.3	66.7	22.2	111.1	122.2	166.7
Cyproconazole	0.049	2.0	2.0	6.5	4.3	8.5	18.3	11.2	7.6	13.1	40.8	16.3	34.7	112.2	61.2	40.8
Epoxiconazole	0.0020	3.5	2.5	13.5	5.0	8.5	18.3	25.5	11.0	23.0	75.0	29.9	60.0	225.0	210.0	60.0
Metconazole	0.0020	4.0	4.0	8.5	10.0	8.0	7.9	15.5	10.0	17.5	50.0	23.6	30.0	110.0	150.0	40.0
Propiconazole	0.0037	2.4	5.9	14.3	12.2	20.5	29.1	35.1	27.0	54.1	94.8	70.9	54.1	459.5	270.3	162.2
Tebuconazole	0.011	3.6	6.8	13.6	18.2	1.8	6.4	74.5	51.8	90.9	363.6	12.0	18.2	636.4	500.0	45.5
Prothioconazole	0.040	ND	2.3	3.5	3.8	5.3	10.2	7.8	7.0	7.3	12.5	16.3	25.0	25.0	25.0	12.5

Figure 9 : Effet *in vitro* des DMI sur la croissance de 19 souches de *Z. tritici* avec identification des divers phénotypes observés dans les isolats étudiés selon leur résistance face aux DMI. a : Valeurs moyennes d'EC₅₀ calculées pour 6 isolats de type sauvage (TriS) ; b : Les facteurs de résistance moyens (EC₅₀ souches TriR / EC₅₀ souches TriS ; ND : Not Determined (non déterminé) (modifié de Leroux et Walker, 2011).

Les études menées en 2011 par Leroux et Walker ont identifié un total de 15 phénotypes à travers les différentes populations de *Z. tritici*, or seulement 7 phénotypes différents avaient été décrits en 2007 (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). La figure 9 ne reprend qu'une partie des DMI avec lesquels les expériences ont été effectuées. Sur celle-ci, il est possible d'observer les gammes de facteurs de résistance propre à chaque phénotype en fonction du fongicide analysé avec une tendance croissante de ces facteurs au fur et à mesure que les phénotypes soient associés à des niveaux de résistance plus élevés. En revanche, le prochloraze semble se comporter différemment que les autres DMI avec un niveau de résistance qui reste faible pour un grand nombre de phénotypes. Les souches faisant partie des phénotypes TriR7 et TriR8 (TriMR) semblent même être sensibles à ce dérivé d'imidazole (Leroux et Walker, 2011).

La figure 10 montre les relations existantes entre les divers génotypes possibles de *Z. tritici* et les phénotypes qui y sont associés selon la combinaison de mutations caractérisant ces

génotypes. Les données proviennent également de Leroux et Walker (2011) ce qui permet de mieux visualiser les relations phénotypes-génotypes qui prennent place au sein des populations de *Z. tritici* et donc d'associer un facteur de résistance précis à des combinaisons de mutations spécifiques (cf. figures 9 et 10).

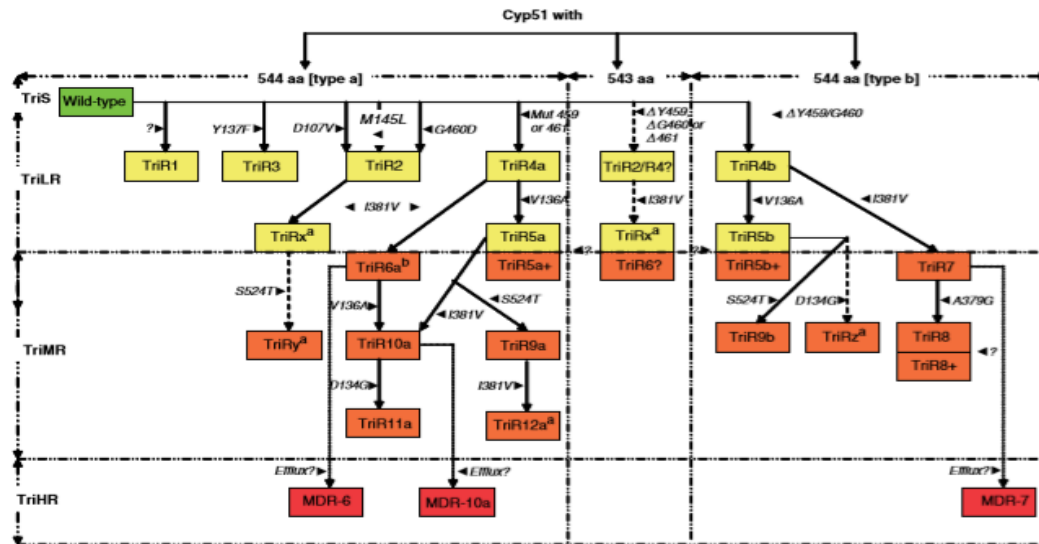


Figure 10 : Relation phénotypes-génotypes dans les souches de *Z. tritici* sensibles (TriS) et résistantes (TriR) aux fongicides DMIs avec la présence possible d'autres mécanismes de résistance. Les différents polymorphismes font référence aux mutations actuellement reportées au sein des populations de *Z. tritici* et ont été identifiés par multiples équipes de chercheurs. MDR : Souches Multi Drug Resistant (modifié de Leroux et Walker, 2011).

Les recherches moléculaires réalisées dans le passé ont démontré que la résistance aux DMIs est généralement liée à des modifications génomiques aux positions 459, 460 et/ou 461. Ainsi, le gène CYP51 peut être divisé en deux génotypes majeurs : le « type a » avec des souches issues des quatre classes phénotypiques et le « type b » comprenant uniquement des souches issues des classes TriLR, TriMR et TriHR (cf. figure 10). La différence est liée à une suppression de six paires de bases menant à une altération Y459/G460 dans le « type b » et un total de 542 acides aminés au lieu de 544 (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). A partir de cette division, la distinction entre les différents phénotypes se fait sur base de la présence de mutations spécifiques ou non au sein du gène CYP51 et selon l'accumulation de celles-ci. Il est à préciser que la figure 10 ne reprend que des mutations pour lesquelles des effets clairs sur le comportement de *Z. tritici* face aux DMIs ont été observés et dont les facteurs de résistance liés à ces mutations ont été décrits dans la littérature.

2.4.3.2 Mutations associées à des niveaux de résistance faibles – Classe phénotypique TriLR

Les phénotypes liés à des niveaux de résistance faibles face aux DMIs font partie de la classe phénotypique principale TriLR. On y retrouve les souches TriR1, TriR2, TriR3, TriR4 et TriR5 avec les souches TriR4 et TriR5 pouvant être de type a ou b selon qu'elles aient la double

délétion ou pas. Les souches TriR1, TriR2 et TriR3 sont uniquement associées au génotype de type a (Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011). Des modifications au niveau des codons 107, 137, 145, 459, 460 ou 461 vont classer la souche étudiée dans un de ces phénotypes de faible niveau de résistance. Les substitutions D107V et M145L caractérisant les souches TriR2 sont rares dans les populations européennes contrairement à la mutation G460D (Cools *et al.*, 2013). Pour les souches TriR5a et TriR5b, on détecte une première association entre deux mutations, cependant le niveau de résistance de ces souches reste faible. Entre les phénotypes TriR4 et TriR5, les facteurs de résistance face à la majorité des DMIs sont plus élevés une fois que la deuxième mutation a été intégrée dans le génome. De ce fait, la substitution de la valine (V) par l'alanine (A) en position 136 semble faire augmenter légèrement la résistance des souches TriR5 par rapport aux TriR4. En revanche, cette substitution induirait une forte diminution du niveau de résistance des souches TriR5 face au tébuconazole contrairement aux autres souches de la classe phénotypique TriLR (cf. figures 9 et 10) (Leroux *et al.*, 2007 ; Cools *et al.*, 2013).

2.4.3.3 Mutations associées à des niveaux de résistance moyens – Classe phénotypique TriMR

Détectée pour la première fois en 2001, la substitution I381V, une fois combinée avec les mutations décrites précédemment, marque la différence entre une souche à niveau de résistance faible d'une souche à niveau de résistance moyen. Ce passage vers un niveau de résistance supérieur se reflète également au niveau des facteurs de résistance par rapport à la majorité des DMIs, excepté pour le prochloraze qui a la même toxicité fongique dans les souches TriR7 et TriR8 que dans les souches de type sauvage (TriS) (Fraaije *et al.*, 2007 ; Leroux *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011 ; Cools *et al.*, 2013 ; Cools *et al.*, 2013). Les isolats TriR6, TriR7 et TriR8 sont les premiers à avoir démontré des niveaux de résistance moyens face à la majorité des DMIs. Ces souches possèdent la substitution I381V combinée soit à un polymorphisme d'acide aminé en position 459 (Y459S/D/N/P) ou 461 (Y461S/H) (TriR6a), soit à la double délétion Δ Y459/G460 (TriR7 et TriR8). Les souches TriR8 ont la substitution A379G en plus par rapport aux souches TriR7, conférant à ces isolats un niveau de résistance légèrement plus élevé (cf. figure 10) (Leroux *et al.*, 2008 ; Leroux et Walker, 2011).

En 2006, une nouvelle mutation a été détectée dans des souches Irlandaises qui ont été classées dans le phénotype TriR9 (TriR9a et TriR9b). Cette altération génomique correspond à la substitution d'une sérine (S) par une thréonine (T) en position 524 (S524T) de la protéine, conférant des facteurs de résistance élevés face au prothioconazole, une triazolinéthione très efficace introduit plus tardivement sur le marché que les autres membres de la famille de DMIs, et au prochloraze. L'année d'après, deux nouveaux phénotypes TriR10a et TriR11a

caractérisés par les génotypes [V136A-I381V-Y461H] et [D134G-V136A-I381V-Y461H] respectivement ont été identifiés. Enfin, le phénotype TriR12 a été associé au génotype [V136A-I381V-Y461H-S524T] contenant la même substitution S524T que dans le phénotype TriR9 mais caractérisé par la présence de la mutation I381V en plus (cf. figure 10) (O’Sullivan *et al.*, 2010 ; Leroux et Walker, 2011 ; Cools *et al.*, 2013).

En 2009, de nouveaux isolats sont identifiés et placés dans la classe phénotypique TriMR. Il s’agit de souches TriR5+ et TriR8+ ayant des génotypes identiques aux souches TriR5 et TriR8 mais démontrant des gammes de facteurs de résistance supérieures face aux DMIs. C’est à ce moment que la notion de souches MDR commence à faire surface indiquant que d’autres mécanismes de résistance pourraient être impliqués dans l’évolution génétique de *Z. tritici* comme par exemple la surproduction de transporteurs membranaires (ABC ou MSF), menant à un efflux accru du fongicide hors de la cellule, ou la surexpression du gène CYP51, induisant une augmentation du taux de l’enzyme au sein de la cellule et donc une augmentation du nombre de sites cibles auxquels le fongicide doit se lier.

2.4.3.4 Mutations associées à des niveaux de résistance élevés – Classe phénotypique TriHR

La classe phénotypique TriHR concerne les isolats de *Z. tritici* démontrant des facteurs de résistance élevés face aux divers DMIs. En 2007, Leroux *et al.* décrit une absence de résistance croisée entre les DMIs et autres toxiques antifongiques. Cependant, quatre années plus tard, des souches montrant des niveaux de résistance élevés face aux DMIs ainsi qu’à d’autres fongicides comme le boscalid (SDHI) et l’azoxystrobine (strobilurines), dont les modes d’action diffèrent de ceux des DMIs, sont détectées. Cependant, Leroux et Walker (2011) remarque que ces souches ont des génotypes identiques aux catégories de souches TriR6, TriR7 et TriR10a. Ces nouveaux phénotypes dénommés MDR6, MDR7 et MDR10a respectivement (Multi Drug Resistant) (cf. figures 9 et 10) possèdent en réalité d’autres mécanismes de résistance comme la surexpression du gène CYP51 ou la surproduction de transporteurs membranaires. Cette dernière semblerait avoir un rôle prépondérant dans l’apparition de ces nouveaux phénotypes notamment par la surexpression du promoteur MFS1 induisant la surproduction transporteurs membranaires de la famille des MFS. A ce jour, la proportion de souches MDR croît à travers les populations de *Z. tritici* mais les mécanismes derrière ces phénomènes de résistance restent difficiles à caractériser (Leroux et Walker, 2011 ; Omrane *et al.*, 2012 ; Cools *et al.*, 2012 ; Omrane *et al.*, 2015 ; Omrane *et al.*, 2017).

2.4.4 Résistance croisée au sein des DMIs

La résistance croisée au sein des DMIs reste incomplète. Chez plusieurs isolats des classes TriLR et TriMR, tels que les phénotypes TriR1, TriR3, TriR5, TriR6, TriR7, TriR8, TriR9 et TriR11a, le contrôle de la maladie repose sur l'utilisation en alternance ou en combinaison de substances plus actives. Chez les autres phénotypes de ces deux classes, comme les souches TriR2 et TriR4, une résistance croisée a été observée entre un très grand nombre de DMIs mais les gammes de facteurs de résistance restent très faibles par rapport à celles des autres phénotypes. Malgré les facteurs de résistance plus élevés, les souches TriHR démontrent également une résistance croisée incomplète face aux DMIs. En revanche, chez les souches MDR, une résistance croisée semblerait avoir lieu non seulement entre certains membres de la famille des DMIs mais également par rapport à d'autres fongicides tels que les SDHI et les strobilurines, suscitant ainsi l'inquiétude chez les agriculteurs et les scientifiques à travers le monde (Leroux et Walker, 2011 ; Cools *et al.*, 2013 ; Cools *et al.*, 2013).

2.5 Situation actuelle et recommandations en matière d'utilisation des DMIs pour minimiser l'apparition des résistances chez *Z. tritici*

Selon Arvalis, entre 2003 et 2015, le pourcentage de souches TriMR dans les populations françaises de *Z. tritici* est passé d'environ 50% à plus de 80% tandis que le pourcentage de souches TriLR est passé d'environ 50% à moins de 5%. De plus, depuis la découverte de souches TriMR évoluées, tels que les TriR5+ et TriR8+, et de souches MDR, la proportion de ces deux phénotypes est passé de 0% en 2008 à 17% en 2015. Aujourd'hui, l'institut Arvalis confirme que la fréquence globale moyenne de ces souches, présentant une résistance moyenne à forte aux DMIs, est passée à plus de 40% dans les populations françaises. Il est à préciser que ces proportions diffèrent d'une région à l'autre même au sein d'un pays. Ceci est à prendre en compte lors de la mise en place d'un programme de traitement car il semblerait en effet qu'une lutte adaptée à la situation locale soit plus efficace et plus durable qu'une lutte globale. Précisons toutefois que ce qui est considéré comme étant local en France est généralement, au vu de l'étendue du territoire wallon, considéré comme global en Belgique. De manière générale, il est recommandé d'alterner les substances actives au sein des DMIs et de diversifier les modes d'action en employant des fongicides issus de différentes classes tels que les SDHI, les DMIs et les inhibiteurs multisites. De plus, il est conseillé de limiter les traitements à maximum deux applications tout en respectant les conditions établies par les instituts tels que le CADCO et Arvalis (Arvalis, 2015 ; Wieczorek *et al.*, 2015 ; Note Commune INRA-ARVALIS-ANSES, 2018 ; Bataille *et al.*, 2018).

3. MATERIEL ET METHODES

Cette section décrit l'ensemble du matériel et des méthodes employés en vue d'atteindre les objectifs de ce travail. Une première partie explique l'origine des différentes populations de souches de *Z. tritici* qui vont être comparées au cours de ce travail. Une deuxième partie développe la méthodologie utilisée pour la caractérisation *in vitro* de la sensibilité des souches face aux fongicides utilisés. Ensuite, une troisième partie reprend les méthodes de caractérisation moléculaire employées pour déterminer le génotype d'une série de souches sélectionnées sur base de la séquence du gène CYP51. Finalement, le matériel et la méthode mis en place pour évaluer la valeur sélective de ces mêmes souches de *Z. tritici* sont décrits dans une quatrième et dernière partie.

3.1 Obtention et préparation des souches de *Z. tritici*

L'objectif de cette partie consiste à préparer toutes les souches de *Z. tritici* pour qu'elles puissent être utilisées dans les expériences suivantes. Dans le cadre de ce travail, différentes collections de souches récoltées en Belgique ont été étudiées. Une ancienne collection de souches, issue de 2008-2009, servira de population de référence afin d'évaluer la différence de sensibilité entre des souches contemporaines (2016-2017) et ces souches plus anciennes et donc d'analyser le changement de comportement de *Z. tritici* face aux triazoles au fil des années. Pour ce qui est des populations de souches de 2016 et de 2017, ayant été isolées, purifiées et mises en collection selon les mêmes méthodes décrites par après, elles permettront d'établir une analyse précise de la situation actuelle de la résistance de *Z. tritici* en Belgique. De plus, étant soumises à différents traitements fongicides spécifiques durant la saison culturale, il sera également possible d'analyser l'effet de ces traitements, couramment appliqués en Wallonie, sur la sélection de résistance dans les populations de souches étudiées.

3.1.1 Souches de 2017

Les populations de *Z. tritici* ont été isolées à partir de feuilles de blé collectées dans deux champs belges, un premier situé à Ath et un deuxième situé à Thy-le-Château. Ceci permet d'évaluer les propriétés de deux populations distinctes de *Z. tritici* en fonction des paramètres environnementaux, météorologiques et agricoles qui leurs sont imposés. Cela rend également possible d'effectuer une analyse plus complète du comportement de *Z. tritici* en Belgique et de vérifier que ce que l'on observe à un endroit s'observe également à un autre endroit et ceci de manière constante dans le temps car la même étude a été réalisée en 2016, comme décrit par après. Le tableau 1 décrit les paramètres culturels de chaque champ dont les données nous ont été communiquées par Duvivier Maxime (CRA-W) et Olivier Mahieu (CARAH).

Tableau 1 : Propriétés des deux champs analysés en 2016 et 2017 selon divers paramètres agricoles, environnementaux et géographiques.

	Thy-le-Château		Ath	
	2016	2017	2016	2017
Géolocalisation	50° 16.621 N // 4° 26.314' E		/	
Province	Namur		Hainaut	
Culture précédente	Pomme de terre		Pomme de terre	Colza
Variété cultivée	Edgar	RGT Reform	Henrik	
Date de semis	13-10-2015	13-10-2016	14-10-2015	21-10-2016
Date de prélèvement des feuilles	27-06-2016	03-07-2017	22-06-2016	30-06-2017
Date de récolte	14-08-2016	22-08-2017	01-08-2016	21-07-2017

Durant la saison 2016-2017, les champs de blé ont été soumis à plusieurs traitements fongicides chimiques bien précis. Chaque champ a été divisé en diverses micro-parcelles de taille identique (2 m x 10-13 m). Parmi ces micro-parcelles, quatre d'entre elles, réparties aléatoirement dans le champ, ont à chaque fois été traitées avec un même traitement fongicide. Dans le cadre de ce travail, quatre traitements fongicides spécifiques dont les descriptifs sont repris dans le tableau 2 ont été sélectionnés. Ainsi, quatre micro-parcelles par traitement fongicide ont été étudiées afin de répéter l'expérience quatre fois pendant la saison. Ce protocole est identique à Ath et à Thy-le-Château.

Afin qu'un nouveau cycle d'infection ait lieu et que les lésions à pycnides soient bien visibles sur les feuilles, il est primordial que le champignon ait suffisamment le temps de se développer et ce, malgré le traitement fongicide qui a été imposé pendant la saison culturale. Dans cet objectif, c'est seulement vers la fin de la saison culturale, environ 3 semaines après le dernier traitement (cf. tableau 1), que les feuilles de blé sont récoltées afin d'en isoler les souches de *Z. tritici*. Ainsi, 10 à 25 feuilles présentant les symptômes caractéristiques de la septoriose (lésions contenant des pycnides) sont prélevées aléatoirement dans une des quatre micro-parcelles où un des quatre traitements spécifiques a été appliqué. Ce processus a donc été répété quatre fois par traitement. Enfin, les feuilles récoltées, ont d'abord été séchées à l'air libre et ont ensuite été stockées à -20°C dans des enveloppes en papier (une enveloppe par répétition/traitement) en attendant d'être utilisées.

Tableau 2 : Descriptif des traitements appliqués durant la saison 2015-2016 (utilisation d'Input (160 g/l prothioconazole (Triazolinthione) + 300 g/l spiroxamine (Spirocétalamine)) au lieu de Kestrel) et durant la saison 2016-2017, de leur dose, matière active, composition, classe, moment d'application sur la plante et de la firme phytopharmaceutique qui les commercialise.

Traitement	Nom du produit et dose	Matière active et composition	Stade végétal	Firme phytopharmaceutique
TE (Témoin)	/	/	/	/
T1	Adexar 1,5 L	62,5 g/L fluxapyroxad (SDHI) + 62,5 g/L époxiconazole (Triazole)	BBCH 39	BASF
T2	Kestrel 1,25 L + Bravo 1 L	160 g/L prothioconazole (Triazolinthione) + 80 g/L tebuconazole (Triazole) + 500 g/L chlorothalonil (Multisite)	BBCH 32	BAYER - AGRI Syngenta
	Adexar 1,5 L	62,5 g/L fluxapyroxad (SDHI) + 62,5 g/L époxiconazole (Triazole)	BBCH 55	BASF
T3	Kestrel 1,25 L + Bravo 1L	160 g/L prothioconazole (Triazolinthione) + 80 g/L tebuconazole (Triazole) + 500 g/L chlorothalonil (Multisite)	BBCH 32	BAYER - AGRI Syngenta
	Adexar 0,8 L	62,5 g/L fluxapyroxad (SDHI) + 62,5 g/L époxiconazole (Triazole)	BBCH 55	BASF

3.1.1.1 Isolements des souches de septoriose

Afin de récupérer les souches de septoriose et de purifier ces isolats pour obtenir des souches monoconidiennes (pures ou génétiquement homogènes puisque descendant d'une seule conidie), une série de manipulations ont été réalisées sur les échantillons de feuilles. Deux étapes majeures sont nécessaires à l'obtention de ces souches au départ d'une lésion à pycnides présente sur un échantillon: (1) le prélèvement du cirrhe (gelée sporifère) et la mise en culture des conidies, (2) la purification de la souche par un isolement monoconidien.

La première étape consiste à promouvoir la sortie des cirrhes afin de récupérer les conidies contenues dans ceux-ci pour finalement permettre leur germination et leur croissance sur un milieu de culture approprié. Pour commencer, un morceau de feuille de blé, doté d'une lésion à pycnides, est fixé à une lame de microscope au moyen de ruban adhésif. Le montage est ensuite placé dans une boîte de Pétri préalablement garnie de papier filtre Whatman #1 imbibé d'eau stérile pour maintenir un taux d'humidité élevé. Après une incubation de minimum 1 à 14 heures, le cirrhe peut être prélevé à l'aide d'une aiguille stérilisée. Un seul cirrhe par lésion est prélevé afin que chaque souche soit génétiquement différente d'une

autre. En effet, les conidies présentes au sein d'un cirrhe ont un bagage génétique identique puisqu'elles sont issues de la reproduction asexuée (=clonage). Le cirrhe est ensuite plongé dans 500 µl d'une solution eau stérile + Tween 20. Le Tween 20, étant un surfactant, permet une meilleure séparation des conidies. A partir de cette solution, 150 µl du contenu sont étalés sur un milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (cf. annexe 1) à l'aide d'un étaleur stérile. Enfin, la boîte de Petri est placée à l'obscurité et à 20-22°C pendant minimum 12 heures pour favoriser la germination des spores. Après 12 heures, la germination des conidies peut être observée à l'aide du microscope inversé Olympus CK2 (Olympus Corporation, Tokyo, Japon).

La deuxième étape, ou isolement monoconidien, a pour but de sélectionner une conidie germée et de la transférer, à l'aide d'un scalpel, dans un nouveau milieu PDA contenant un antibiotique, le Chloramphénicol, afin de poursuivre sa croissance et générer une culture pure tout en évitant toute contamination bactérienne. Ceci permet d'isoler un thalle fongique ayant la même information génétique dans une seule boîte et ainsi d'obtenir une souche d'origine monoconidienne. Cette opération est répétée deux fois par boîte afin de s'assurer qu'au moins une des deux conidies sera viable (cf. figure 11). Le nouveau milieu PDA + Chloramphénicol contenant les deux conidies est finalement placé en chambre noire à 20-22°C pendant environ 2-4 semaines.

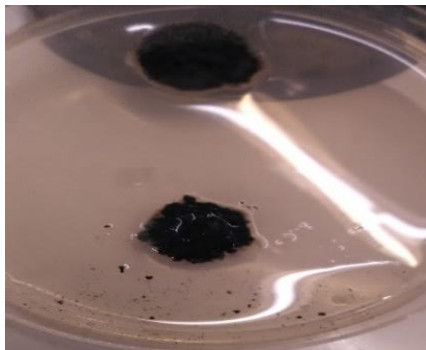


Figure 111 : Milieu PDA + Chloramphénicol sur lequel deux conidies d'une souche de *Z. tritici* ont poussé pendant 3 à 4 semaines d'incubation à 20-22°C suivant l'isolement monoconidien de la souche et sur lequel la phase de collection est entamée.

3.1.1.2 Phase de collection

Après leur croissance, les souches doivent être mises en collection afin d'être conservées de manière adéquate et (ré)utilisées dans de futures expériences. Lorsque les deux conidies d'une boîte ont atteint une croissance similaire à celle visible sur la figure 11, la phase de collection peut prendre place. Il est à préciser que seulement un des deux individus par boîte est mis en collection. Deux ml d'une solution eau-glycérol 30% sont appliqués sur un des deux individus qui est ensuite gratté au moyen d'une lame de microscope stérile afin de mettre les spores et autres particules de champignon en suspension. Cette suspension est

transférée, d'une part, dans un tube stérile de 2 ml et placée à -80°C et, d'autre part, dans un tube contenant du milieu PDA incliné (cf. annexe 1) conservé à température ambiante. Le glycérol est un cryoprotecteur qui permet la survie et préservation de la souche à -80°C car il va protéger les cellules fongiques contre la déshydratation induite par la formation de la glace intracellulaire pendant la congélation. Après une semaine de croissance en chambre noire à 20-22°C, 10 ml de paraffine liquide sont ajoutés dans le tube de PDA afin de stopper le développement du champignon tout en évitant son déclin. Ainsi, chaque souche peut être conservée et utilisée pour de nombreuses années.

Pour le champ situé à Thy-le-Château, cette étape d'isolement a été réalisée sur les échantillons provenant de chaque micro-parcelle avec un total de 25 lésions analysées par micro-parcelle. Pour le champ d'Ath, le même travail a été réalisé par Alice Nysten. Certaines souches sont issues d'une même feuille mais de lésions différentes en raison d'un manque de feuilles de blé avec présence de la maladie. Cependant, elles ont été isolées mais pas mises en priorité pour la suite du travail.

3.1.2 Souches de 2016

Les souches de 2016 étaient déjà disponibles au sein de l'unité de phytopathologie. Elles ont été conservées dans des tubes PDA sous huile de paraffine après leur isolement. La stratégie pour l'isolement des souches de 2016, également venant d'Ath et de Thy-le-Château, a été identique à celle opérée en 2017. Ainsi, elles ont été sélectionnées dans le cadre de cette étude, d'une part, afin de représenter, avec les souches de 2017, les souches contemporaines pour l'analyse du changement de comportement de *Z. tritici* face aux triazoles en fonction du temps et, d'autre part, afin d'évaluer l'évolution de la résistance au sein de populations belges de *Z. tritici* issues de feuilles traitées au champ et préparées *in vitro* sur un certain laps de temps, dans ce cas sur une année. Comme pour l'année 2017, les paramètres culturels de chaque champ sont décrits dans le tableau 1 et le descriptif des traitements fongicides appliqués durant la saison est repris dans le tableau 2.

3.1.3 Souches de 2008-2009

Les souches monoconidiennes de 2008 et 2009 ont été sélectionnées dans la collection de l'unité de phytopathologie. Contrairement aux souches de 2016, elles ont été conservées dans des tubes de 2 ml à -80°C depuis leur isolement. Ces souches proviennent de populations récoltées dans huit localisations différentes en Belgique et ont été prélevées sur feuilles qui n'ont été soumises à aucune pression fongicide durant la saison culturale. Ceci afin d'évaluer le changement de comportement entre des populations belges de *Z. tritici* isolées dans des

parcelles non-traitées en fonction du temps. En effet, il y a 10 ans, certains fongicides de la famille des triazoles, comme le prothioconazole, ou encore des SDHI, n'étaient pas autant employés qu'ils ne le sont aujourd'hui tandis que d'autres, comme le tébuconazole, étaient déjà fortement présents sur le marché belge. Ainsi, les populations de *Z. tritici* isolées à ce moment-là pourraient présenter des comportements différents face aux substances actives étudiées dans le cadre de ce travail.

3.2 Caractérisation *in vitro* de la sensibilité des souches de *Z. tritici* aux triazoles sur base des EC₅₀ en plaque multipuits

Pour caractériser la sensibilité des souches de *Z. tritici* aux triazoles, deux membres de cette famille chimique, le tébuconazole et le prothioconazole, ont été sélectionnés. Nous rappelons que le prothioconazole est un dérivé de triazolinthione mais que pour des raisons de facilité, le terme 'triazole' sera employé tout au long du travail pour faire référence au prothioconazole également. Le choix de ceux-ci se porte sur le fait qu'il s'agit de deux substances fortement présentes sur le marché belge et européen.

La sensibilité d'une souche est mesurée en estimant son EC₅₀ face à un fongicide. La notion d'EC₅₀ fait référence au terme 'effective control to 50%' ou 'concentration efficace médiane'. Le calcul de cette valeur revient à évaluer la concentration de fongicide nécessaire pour inhiber de 50% la croissance d'un organisme par rapport à un contrôle non traité et permet donc de quantifier l'efficacité d'une substance active contre une souche. Pour obtenir cette valeur, nous nous sommes basés sur des 'tests fongicides en plaque multipuits'. Cette méthode consiste à évaluer l'EC₅₀ d'une souche pour une matière active donnée par l'utilisation d'une régression logistique des courbes de pourcentages d'inhibition de la croissance de cette souche en fonction de huit concentrations (0, 0.04, 0.123, 0.37, 1.1, 3.3, 10 et 30 mg/l) en matière active distribuées dans la plaque. Grâce à ces valeurs et en se basant sur des résultats préalablement décrits dans des recherches traitant le même sujet, il nous sera possible de classer les souches des différentes populations en fonction de leur phénotype de résistance ou tolérance face aux deux matières actives étudiées.

Le protocole suivi pour cette partie du travail se déroule en quatre étapes : (1) sélection des souches et préparation de l'inoculum, (2) préparation des fongicides, (3) inoculation des plaques multipuits, (4) lecture des plaques inoculées et traitement des données. Ces étapes décrites ci-dessous constituent la méthode générale de réalisation des 'tests fongicides en plaque multipuits'. Il a été possible de répartir le travail en huit jours puisque 20 souches peuvent être analysées par jour selon cette technique.

3.2.1 Sélection des souches et préparation de l'inoculum

La sélection des souches de 2008-2009, au nombre de 62, s'est faite par une simple séparation à parts égales entre Alice Nysten et moi-même. Pour les souches de 2017, la sélection de 15 souches par traitement par champ a été faite de manière aléatoire sachant qu'Alice Nysten a sélectionné les 60 souches provenant de Ath et que les 60 souches provenant de Thy-le-Château ont été sélectionnées par moi-même. Ce même processus a été suivi pour les souches de 2016.

Les souches sélectionnées en collection sont revivifiées par mise en culture sur un milieu Yeast Malt Agar (YMA) (cf. annexe 1) fraîchement préparé. Celles de 2017 et de 2008-2009, conservées à -80°C, sont lentement dégelées sur glace par exposition des tubes contenant les suspensions de conidies à des températures croissantes pendant minimum 1 heure afin de ne pas brutalement rompre le cycle gel/dégel ce qui pourrait dégrader la viabilité du champignon. Une fois les suspensions dégelées, 30 à 50 µl de chaque suspension sont étalés sur boîte de Pétri de 5 cm de diamètre contenant un milieu YMA. Les souches de 2016, conservées dans des tubes PDA sous huile de paraffine à température ambiante, ont été repiquées directement sur milieu YMA. Une fois que toutes les souches à analyser ont été repiquées, elles sont mises à incuber à l'obscurité pendant sept jours à 20-22°C afin de favoriser leur croissance et sporulation. Au bout des sept jours, 6 ml de Potato Dextrose Broth (PDB) (cf. annexe 1) sont ajoutés dans chaque boîte YMA contenant une souche. Les boîtes sont grattées à l'aide d'une lame de microscope stérile pour libérer les spores. La solution est filtrée à travers un filtre stérile (pores de 100 µm) pour récupérer la suspension de spores dans un falcon de 50 ml et la concentration de spores est ensuite mesurée à l'aide d'une cellule THOMA (cf. annexe 2). Enfin, la suspension concentrée est diluée dans du PDB dans un falcon de 15 ml afin d'obtenir une suspension à 100 000 conidies/ml.

3.2.2 Préparation des fongicides

Comme énoncé précédemment, deux fongicides sont testés lors de cette expérience. Ils étaient déjà disponibles et conservés au sein de l'unité de phytopathologie à une température de 4°C. Ceux-ci sont dilués en suivant un protocole de dilution précis (cf. annexe 3).

Au départ d'une solution stock de fongicide à 40 mg/ml, une première dilution d'un facteur 10 est effectuée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) afin d'obtenir une concentration égale à 30 mg/l dans le premier milieu final. Ensuite, six dilutions successives d'un facteur 3 sont réalisées dans le DMSO pour obtenir des concentrations correspondant à 10, 3.3, 1.1, 0.37, 0.123 et 0.04 mg/l de fongicide dans le milieu final. Chacune de ces concentrations est

finalement diluée selon un facteur 100 dans du PDB. Pour la concentration 0 mg/l, c'est-à-dire le milieu témoin sans fongicide, l'équivalent en DMSO est ajouté au PDB. Au total, chaque fongicide est dilué sept fois dans du DMSO afin d'obtenir huit concentrations différentes (0, 0.04, 0.123, 0.37, 1.1, 3.3, 10 et 30 mg/l) pour le remplissage des plaques multipuits.

3.2.3 Inoculation des plaques multipuits

Une plaque multipuits est caractérisée par 96 puits disposés en 12 lignes et 8 colonnes. De ce fait, le remplissage se déroule en deux étapes successives : (1) remplissage des colonnes, (2) remplissage des lignes. La figure 12 illustre la répartition des concentrations en fongicides et des suspensions de conidies dans les différents puits d'une plaque multipuits.

Colonnes Lignes	H	G	F	E	D	C	B	A
1	0	0,04	0,123	0,37	1,1	3,3	10	30
2	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
3	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
4	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
5	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
6	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
7	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
8	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
9	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
10	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
11	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+
12	0+	0,04+	0,123+	0,37+	1,1+	3,3+	10+	30+

Figure 12 : Répartition des dilutions de fongicides et des suspensions conidiennes dans les 96 puits d'une plaque multipuits. Les 8 colonnes de la plaque sont remplies avec une concentration de fongicide spécifique (mg/l) selon la colonne, sauf pour la première (0 mg/l). Ensuite, les lignes 2 à 12 de la plaque sont inoculées (+) avec 11 souches différentes (une même souche par ligne), avec une souche de référence dans la deuxième ligne qui est analysée dans chaque plaque comme contrôle interne. La première ligne n'est pas inoculée.

En ce qui concerne les colonnes, la première (avec les '0' et '0+') est remplie uniquement avec 150 µl de PDB + DMSO afin d'évaluer la croissance d'une souche lorsqu'elle n'est pas confrontée à un fongicide. Les sept autres colonnes sont remplies avec 150 µl de PDB + fongicide allant de la plus faible concentration (colonne G) à la plus haute concentration

(colonne A). Pour les lignes, la ligne 1 a été remplie uniquement avec 50 µl de PDB et sert de contrôle négatif. La ligne 2 a été inoculée avec 50 µl de solution de spores issue de la souche de référence et sert de contrôle inter-plaque. Enfin, toutes les autres lignes ont été inoculées avec 50 µl de suspension conidienne issue des différentes souches sélectionnées depuis la collection. Précisons que la souche de référence est une souche d'Irlande montrant une résistance face au tébuconazole et une sensibilité face au prothioconazole. Une fois toutes les plaques remplies, elles sont mises à incuber à l'obscurité pendant une semaine à 20-22°C afin de favoriser la croissance du champignon.

3.2.4 Lecture des plaques inoculées et traitement des données

Après sept jours d'incubation, la mesure de l'absorbance de chaque puits des plaques multipuits est réalisée avec un spectrophotomètre Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlande) à une longueur d'onde de 405 nm afin d'évaluer la croissance fongique de chaque souche selon les huit concentrations en fongicide. La croissance fongique est en effet corrélée à l'absorbance. Les résultats d'absorbance sont ensuite enregistrés sur un ordinateur afin d'être interprétés par la suite. Les puits non inoculés permettent d'évaluer l'absorbance du milieu en l'absence d'inoculum pour chacune des concentrations de fongicide et donc le biais en absorbance lié à la présence de fongicide. Les puits sans fongicide permettent d'évaluer l'absorbance du milieu en l'absence de matière active pour chacune des souches et donc la croissance des souches sans fongicide. Ainsi, la croissance d'une certaine souche en fonction de chaque concentration de fongicide est calculée par rapport à la mesure d'absorbance dans le puit sans fongicide et inoculé avec la même souche.

Le programme R Studio rend possible, via la mise en place d'un script approprié (cf. annexe 4), la transformation des données d'absorbance, pour une souche confrontée à une matière active, en valeur EC_{50} correspondante. La courbe logistique ainsi obtenue permet de visualiser graphiquement le pourcentage d'inhibition de la croissance d'une souche en fonction de la concentration en fongicide.

Deux répétitions étant réalisées par plaque et donc par souche, la moyenne des deux valeurs EC_{50} pour une souche est calculée sur base des résultats des deux plaques différentes. Un facteur correctif est déterminé sur base de la valeur EC_{50} de la souche de référence par plaque par rapport à la valeur EC_{50} moyenne de cette souche de référence pour l'ensemble des tests réalisés avec le même fongicide. En effet, chaque facteur correctif est déterminé en fonction d'un seul fongicide. Cela permet de normaliser toutes les valeurs EC_{50} pour l'entièreté des souches par fongicide et face à une même souche de référence. Finalement, les valeurs EC_{50}

corrigées sont transformées en valeurs logarithmiques ($\log_{10}$) afin de construire un jeu de données suivant une distribution normale permettant ainsi l'analyse statistique comparative.

3.3 Caractérisation moléculaire du gène CYP51 des souches de *Z. tritici*

Cette troisième partie reprend les méthodes de caractérisation moléculaire employées pour observer la présence potentielle de mutations au sein du gène CYP51 pour une série de souches. Comme évoqué précédemment, une valeur EC_{50} est un outil permettant d'évaluer la sensibilité d'une souche face à une matière active précise sur une base phénotypique. Plus cette valeur EC_{50} est élevée, plus la souche est considérée comme résistante et inversement. Un panel de 28 souches d'intérêt a été sélectionné sur base de leurs valeurs EC_{50} face aux triazoles et aux SDHI. La prise en compte de la résistance aux SDHI a été intégrée dans la mesure où ce caractère fait l'objet d'une étude poursuivie dans le cadre d'un autre mémoire réalisé par Alice Nysten cette année.

La caractérisation génotypique se déroule en quatre étapes : (1) extraction de l'ADN des souches, (2) amplification en chaîne par polymérase (PCR=Polymerase Chain Reaction) du gène CYP51, (3) électrophorèse sur gel d'agarose et purification des extraits d'ADN, (4) séquençage des fragments d'ADN et traitement des données.

3.3.1 Extraction de l'ADN des souches

L'ADN des souches sélectionnées a été extrait à partir de mycélium de chaque souche, prélevé dans les puits témoins des plaques multipuits, selon le protocole d'extraction CTAB. Les différentes étapes de ce protocole sont reprises dans l'annexe 5. Les objectifs recherchés derrière les étapes clés du protocole sont discutés ci-dessous. La préparation du tampon CTAB est également décrite dans l'annexe 5.

Tout d'abord, un broyage du mycélium en microtube réalisé au FastPrep® 120 Cell Disrupter System (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) et à l'aide de microbilles de silicate de zirconium (0.5 mm de diamètre) permet de casser les cellules fongiques afin de faire sortir l'ADN. L'ajout de tampon CTAB avant le broyage est primordial pour réaliser une bonne extraction. Celui-ci a pour but final de lyser les membranes (cellulaires et nucléaires) et de dénaturer les protéines associées à l'ADN. En effet, le tampon contient de nombreux composés dont le CTAB qui a un rôle de détergent. Il permet de disperser les bicouches lipidiques des membranes et favorise ainsi la lyse des cellules. On y retrouve également de l'EDTA qui est un composant de chélation capable de lier certains métaux dont le magnésium, un cofacteur pour la DNase. En se liant au magnésium, l'EDTA bloque donc l'activité de ces nucléases. Finalement, le TRIS combiné à du NaCl permet d'atteindre un niveau de pH stable

(≈ 8.0) pour éviter la dégradation des acides nucléiques. Ensuite, l'ajout d'une solution chloroforme : alcool isoamylique permet l'élimination des impuretés telles que les composés phénoliques, les polysaccharides, les protéines et autres constituants cellulaires dissous dans la solution aqueuse. Sans cette étape, les impuretés ne sont pas séparées des acides nucléiques et peuvent ainsi bloquer les réactions enzymatiques qui ont lieu durant l'amplification de l'ADN par PCR. Il s'ensuit une précipitation des protéines dénaturées avec la création de deux phases distinctes : (1) une phase aqueuse surnageante contenant les acides nucléiques en solution est obtenue alors que (2) les composés phénoliques, les polysaccharides et autres impuretés sont retenus dans une phase organique au fond du tube. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube après vortex et centrifugation.

Le détergent préalablement ajouté doit finalement être séparé de l'ADN. Pour cela, une solution de précipitation (PEG 30% – NaCl) est mélangée avec la phase aqueuse contenant l'ADN. La précipitation des acides nucléiques prend place et le détergent est éliminé. Le culot est rincé par de l'éthanol 70% et après évaporation de ce dernier, l'ADN est redissout dans de l'eau à usage biomoléculaire. Une fois le protocole CTAB terminé, les tubes contenant l'ADN extrait des différentes souches sont conservés à -20°C . La concentration et la pureté des extraits d'ADN ont ensuite été mesurées à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Ceci est crucial pour l'étape d'amplification du gène CYP51 par PCR qui requiert une concentration et un niveau de pureté adéquats. Ce spectrophotomètre mesure l'absorbance du milieu grâce au passage d'un faisceau de lumière. Ainsi, trois propriétés de l'échantillon sont analysées et mesurées : la concentration en ADN ($\text{ng}/\mu\text{l}$), la valeur du rapport 260/280, qui fait référence à la présence ou non d'impuretés telles que des protéines et des polysaccharides, et la valeur du rapport 260/230 démontrant la présence ou non de sels et autres impuretés. Afin que la PCR se déroule dans les meilleures conditions, il faut obtenir typiquement les résultats suivants : une valeur du ratio 260/280 la plus proche possible de 1.8, une valeur du ratio 260/230 la plus proche possible de 1.8-2.2 et une concentration minimale de 10-15 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Toute valeur n'étant pas suffisamment proche des valeurs décrites ci-dessus signifie que l'ADN extrait est impur. Les échantillons ont ensuite été dilués afin d'obtenir une concentration d'ADN comprise entre 25 et 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

3.3.2 Amplification en chaîne par polymérase (PCR) du gène CYP51

Cette étape consiste à amplifier le gène CYP51 par PCR. Elle permet d'obtenir un grand nombre de copies de la séquence du gène à partir d'une très faible quantité d'ADN présente dans les échantillons. Ceci se fait à l'aide d'un cycle thermodynamique parfaitement réglé et

d'amorces ciblant des séquences nucléotidiques situées de part et d'autre de la séquence à amplifier, appelée amplicon.

Différents réactifs sont impliqués dans le processus d'amplification et un mélange de ces réactifs, appelé mix, doit être réalisé au préalable dans les proportions adéquates. Parmi ces réactifs, les dNTP sont les éléments de synthèses utilisés par la polymérase qui assure la polymérisation des nouveaux brins d'ADN complémentaires. Les amorces sens et antisens, spécifiques à la séquence d'ADN voulue, permettent de démarrer l'activité de l'enzyme. Enfin, le tampon sert à garder le pH du milieu réactionnel stable afin que la polymérase puisse fonctionner de manière optimale. Le mix dont la composition est détaillée dans le tableau 3 est complété par 2.5 µl d'ADN dilué. Après homogénéisation et centrifugation, les tubes contenant chacun 25 µl du mix sont placés dans le thermocycleur et la PCR est démarrée. Il est important d'ajouter un témoin positif, c'est-à-dire une souche préalablement testée et donnant des résultats attendus, ainsi qu'un témoin négatif (sans ADN) afin de s'assurer de l'absence de contamination.

Tableau 3 : Quantité des différents réactifs PCR à insérer dans le mix après avoir multiplié par n échantillons pour la PCR ciblant le gène CYP51.

	1 échantillon
MIX (Volume final = 25 µl)	
Eau biomol	14.25
Tampon	5
dNTP	0.5
Amorce Forward (10 µM)	1.25
Amorce Reverse (10 µM)	1.25
Q5 polymérase	0.25
ADN (25-50 ng/µl)	2.5

La PCR se base sur une répétition de cycles se déroulant à des températures différentes et durant des laps de temps très précis. On distingue dans notre cas et de manière générale quatre phases principales : (1) la dénaturation initiale à 98°C pendant 30 secondes, (2) la phase de dénaturation à 98°C pendant 10 secondes, (3) la phase d'hybridation ou d'appariement des amorces à 65°C pendant 30 secondes, (4) la phase d'élongation à 72°C pendant 1 minute. Le cycle (2)-(3)-(4) est répété 40 fois dans le cas du gène CYP51. Ensuite, une température de 72°C est appliquée pendant 2 minutes pour finalement descendre jusqu'à 4°C. Cette dernière étape permet de conserver les produits PCR durant quelques heures. Désormais, les extraits d'ADN sont amplifiés.

3.3.3 Electrophorèse sur gel d'agarose et purification des extraits d'ADN

3.3.3.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Après amplification, il est essentiel de savoir si les fragments d'ADN ont été amplifiés correctement et si leurs tailles correspondent à la taille du fragment attendu. Pour vérifier cela, une électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% dans du tampon TBE 1x concentré est réalisée. Cette technique permet de séparer les acides nucléiques chargés négativement grâce à l'application d'un champ électrique. Le gel contient également du BET (10 µg/ml). Il s'agit d'un colorant fluorescent très utilisé pour le marquage et la détection des acides nucléiques. En effet, ses propriétés structurales lui permettent de s'intercaler entre les paires de bases. Avant de remplir le gel, 5 µl du produit PCR sont mélangés à un indicateur coloré, du Benchtop à une échelle de poids moléculaire de 1 kb, ainsi qu'à un alourdisseur, notamment du bleu de charge (6x Loading Dye). L'indicateur coloré permet de visualiser le produit PCR dans le gel à la taille adéquate tandis que l'alourdisseur sert à faire tomber l'échantillon coloré au fond des puits du gel. A partir de ce mélange, réalisé pour chaque échantillon, 5 µl sont déposés dans les puits du gel. Après environ 1 heure de migration, le gel est placé sous UV afin que le BET devienne fluorescent ce qui permet de réaliser une photographie du gel et de visualiser les bandes d'amplification, dans ce cas à une taille de 2 kb. Il est à préciser que le BET est une molécule hautement mutagène et doit être manipulé avec extrême prudence.

3.3.3.2 Purification d'ADN

Avant de préparer la réaction de séquençage, une dernière étape de purification de l'ADN sur gel a été pratiquée afin de sélectionner les fragments du gène CYP51 et d'éviter les interférences avec les produits d'amplification aspécifiques parfois présents après la PCR. Cette purification a été réalisée via la méthode Smartpure Gel kit de Eurogentec selon le protocole décrit par la firme. Avant de débiter, un nouveau gel d'agarose est rempli avec le restant du contenu des produits PCR (20 µl). Ensuite, on coupe directement dans le gel le fragment d'ADN correspondant à la souche étudiée. L'ADN, une fois purifié, est conservé à -20°C. Après purification, la concentration et la pureté sont contrôlées au Nanodrop 1000. Une quantité supérieure ou égale à 15-20 ng/µl est généralement suffisante.

3.3.4 Séquençage des fragments d'ADN et traitement des données

Pour le séquençage, 5 µl du produit purifié sont ajoutés à 1.25 µl d'amorce forward du fragment concerné et 3.75 µl d'eau biomol. Si la concentration en ADN atteint une valeur inférieure à 13 ng/µl, 7 µl sont ajoutés à 1.25 µl d'amorce forward et 1.75 µl d'eau biomol.

Dans les deux cas, un volume total de 10 µl est atteint dans chaque eppendorf de 1.5 ml. Comme la séquence du gène CYP51 est relativement longue (1907 pb), trois amorces forward (CYP51-F1, CYP51-F2 et CYP51-F3) sont employées afin de s'assurer que l'entièreté de la séquence soit obtenue (cf. tableau 4). Chaque produit PCR purifié est réparti en trois tubes numérotés correctement selon l'amorce introduite. Au total, trois microtubes par souche sont donc envoyés aux sociétés MacroGen ou Eurofins spécialisées dans le séquençage d'ADN.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification du gène CYP51 de *Z. tritici*.

Amorce	Séquence de nucléotides (5'-3')
CYP51-F1	AACGCGACCTCAACATCTCT
CYP51-F2	GACCGCAACAACCCTCATAA
CYP51-F3	GCAAATACAAGGACGGCAAT
CYP51-R1	TGACACTCGCGCTATTCATT
F : amorce forward (sens) R : amorce reverse (antisens)	

Une fois les séquences réceptionnées, les différents fragments propres à une seule souche sont rassemblés sous forme de contig et corrigés avec le programme Sequencher® 4.8 (Gene Codes Corporation). Ensuite, la séquence nucléotidique complète de chaque souche est alignée sur la séquence de référence (Mycgr3G110231 ; www.fungi.ensemble.org) du gène CYP51 d'une souche wild-type (IPO323) via le programme Ugene (Unipro Ugene) afin d'enlever les parties non codantes du gène. Enfin, le programme Ugene permet de traduire la séquence obtenue en une séquence d'acides aminés correspondante qui est finalement comparée à la séquence d'acides aminés de la souche wild-type.

3.4 Evaluation de la valeur sélective des souches de *Z. tritici*

Cette quatrième partie a pour but de mesurer la valeur sélective de 25 souches de *Z. tritici* afin de comparer leur capacité d'infection et de survie sur plante dans des conditions similaires à celles présentes dans la nature en fonction de leur niveau de résistance/sensibilité face aux triazoles. Cette valeur sélective a été mesurée en étudiant, en conditions contrôlées et après inoculation d'une quantité connue de conidies, l'évolution des symptômes et des différentes phases du cycle de développement de *Z. tritici* sur quatre variétés de blé. L'objectif est de refléter au maximum l'épidémiologie de la maladie et le développement de *Z. tritici* dans les champs belges et d'évaluer si les souches les plus résistantes, et de ce fait les plus contraignantes pour l'agriculture, sont viables dans un environnement naturel nécessitant ainsi un nouveau ou meilleur plan d'action contre la septoriose.

Le protocole suivi pour cette partie se déroule en quatre étapes : (1) préparation des

conditions *in vivo* et du matériel végétal, (2) choix des souches de *Z. tritici*, (3) préparation de l'inoculum et inoculation du matériel végétal, (4) évaluation du développement de la maladie.

3.4.1 Préparation des conditions *in vivo* et du matériel végétal

Les expériences sur plante ont été réalisées dans une serre type G2Q. Il s'agit d'une serre isolée des autres dans laquelle les différents paramètres bioclimatiques (humidité relative, température, etc.) sont très contrôlés et favorables à l'infection et le développement de notre agent phytopathogène tout en évitant les contaminations de l'environnement externe. Durant la croissance du blé, les conditions dans la serre sont fixées à une température de 10-15°C et une humidité relative d'environ 90%. Une fois que le stade végétatif voulu est atteint pour l'étape d'inoculation, la température est réglée à 15-20°C tandis que l'humidité relative reste identique. Les conditions présentes dans la serre à un moment précis sont réglées de manière à favoriser l'étape de l'expérience en cours.

Concernant le matériel végétal, nous avons testé quatre variétés de blé présentant des niveaux de résistance contrastés face à la septoriose (cf. tableau 5). Les variétés RGT Reform (= : moyennement sensible) et Henrik (- : assez sensible) ont été choisies pour cette étude car il s'agit des mêmes variétés sensibles utilisées dans les essais menés à Thy-le-Château et Ath respectivement durant la saison 2016-2017. Les variétés Olympus (++ : résistante) et Chevignon (+ : peu sensible) ont été choisies car elles montrent des niveaux de résistance plus élevés à la septoriose.

Tableau 5 : Variétés de blé employées sur base de leur cotation et leur sensibilité vis-à-vis de la septoriose en 2017. Les cotations du niveau de résistance proviennent du Livre Blanc Céréales (Edition 2018) et nous ont été transmises par Maxime Duvivier (CRA-W) excepté pour la variété Chevignon.

Variété de blé	Cotation en 2017	Sensibilité
Chevignon	7.0*	+ (ou ++)*
Henrik	6.5	-
Olympus	9.0	++
RGT Reform	6.5	=
- : assez sensible + : peu sensible = : moyennement sensible ++ : résistante * donnée venant de l'institut Arvalis		

Les graines de blé sont nettoyées dans un erlen contenant de l'eau à l'aide d'un barreau magnétique. Ceci permet d'enlever une grosse partie du produit avec lequel les graines ont préalablement été traitées. Ensuite, quatre graines sont plantées par pot carré de plantation de 10 cm rempli d'un substrat terreau et sable fin 50:50 afin d'obtenir au moins trois plantules viables. Après le remplissage des pots, les plants de blé sont laissés à une température de 10-

15°C et une humidité relative d'environ 90% jusqu'à ce que la troisième feuille à apparaître soit étalée. Pendant ce temps-là, il est nécessaire d'arroser régulièrement les plants et d'ajouter une solution nutritive (Hoagland) pour stimuler la croissance du blé. Nous avons décidé d'examiner trois feuilles par pot avec un total de trois pots par souche et par variété. Ainsi, nous pouvons analyser nos résultats en se basant sur une multitude de répétitions. En plus de nos 25 souches, nous avons ajouté une série témoin, sans souche et sans eau + Tween, et une série uniquement sans souche afin d'évaluer, au sein d'une même variété, la différence qui survient entre les symptômes observés sur les feuilles des plantules non inoculées, des plantules inoculées et des plantules recevant uniquement la solution eau + tween. Ainsi, 27 séries de trois pots sont réalisées par variété de blé ce qui revient à la préparation de 324 pots de plantation.

3.4.2 Choix des souches de *Z. tritici*

Nous avons choisi les mêmes souches que celles sélectionnées préalablement pour la caractérisation moléculaire du gène CYP51. En effet, ces souches ont montré des valeurs d'EC₅₀ élevées ou faibles et sont donc associées à des niveaux de résistance différents face aux triazoles. De plus, les résultats issus de la caractérisation moléculaire du gène CYP51 de ces souches ont pu montrer à quoi ces niveaux de résistance sont possiblement liés. En les choisissant pour cette partie du travail, un facteur supplémentaire, c'est-à-dire la valeur sélective, pourra être caractérisé et analysé en relation avec les autres données. Deux souches ont été rajoutées afin de pouvoir faire une comparaison entre une grande majorité de souches issues de nos expériences et des souches venant d'autres recherches ainsi que d'autres pays. Il s'agit des souches 09-BDEb et OP-15-13 appartenant aux catégories 'Résistance Triazoles – Sensible SDHI' et 'Sensible Triazoles – Résistance SDHI' respectivement.

3.4.3 Préparation de l'inoculum et inoculation du matériel végétal

Trente à 50 µl de suspension conidienne sont étalés sur boîte YMA afin de permettre leur revivification. Après une semaine d'incubation à 20-22°C et à l'obscurité, les souches ont atteint la croissance voulue. Les étapes suivies sont similaires à celles discutées dans la section 3.2.1. hormis quelques changements tels que l'utilisation d'une solution eau + tween 20 (5 ml) au lieu de PDB pour le grattage. Après filtration à travers un filtre stérile (pores de 100 µm) et comptage à l'aide d'une cellule THOMA, la suspension concentrée est diluée dans un falcon de 15 ml afin d'obtenir une solution à 150 000 particules/ml. Cette concentration a été choisie sur base d'un test préliminaire. Finalement, une solution eau + Tween 20 est ajoutée afin

d'obtenir un volume total de 10 ml ce qui permet d'inoculer la totalité des feuilles destinées pour une souche.

Après environ 2 à 3 semaines de croissance, les plantules de blé atteignent la croissance souhaitée. Le plus important est que la feuille à inoculer, c'est-à-dire la troisième feuille formée, soit visible et bien étalée. Nous avons attendu 24 jours pour débiter l'inoculation pour des raisons d'organisation, de disponibilité du matériel et de paramètres bioclimatiques. En effet, les paramètres de la serre ont été fixés à 15-20°C au lieu de 10-15°C pour favoriser l'infection du blé par *Z. tritici* et accélérer le développement de la maladie. Comme quatre graines ont été plantées par pot et que l'inoculation se déroule seulement sur trois feuilles par pot, une plantule par pot est coupée. Afin d'inoculer la même surface végétale pour l'entièreté des feuilles, une zone de 5 cm a été délimitée sur la feuille d'intérêt de chaque plantule à l'aide d'un feutre indélébile. Ceci permet également de faciliter l'observation des divers critères décrits par après.



Figure 13 : Inoculation d'une solution de spores dans la zone délimitée sur la F3 d'une plantule de blé.

Une fois une zone de 5 cm délimitée, la solution de spores est étalée délicatement à l'aide du pinceau préalablement autoclavé (cf. figure 13). Comme expliqué ci-dessus, trois feuilles par pots sont inoculées avec une même souche. En comptant trois pots par variété et un total de quatre variétés, nous inoculons un total de 36 feuilles avec une même souche. Une fois les 27 séries réalisées, les pots sont disposés aléatoirement sur des tables de façon à ne jamais placer deux pots inoculés avec la même souche l'un à côté de l'autre. Il est également important que les zones inoculées des feuilles de différents pots ne se touchent pas afin que chaque feuille soit uniquement en contact avec une seule souche de *Z. tritici*. Après l'inoculation, des bâches en plastique transparent sont placées au-dessus des tables contenant les pots disposés aléatoirement afin d'augmenter l'humidité et de favoriser l'infection du blé par le champignon. Ces chambres humides sont créées en plaçant une bâche transparente (2m x 3m) sur des tuteurs de 30 cm répartis à six endroits différents de la table comme visible sur la figure 14. La bâche est ensuite collée à la table afin d'éviter une entrée d'air trop importante

ce qui pourrait faire diminuer l'humidité à l'intérieur de la serre. Ainsi, une humidité relative d'environ 100% est atteinte pour que l'infection du blé par *Z. tritici* soit fortement favorisée, comme décrit dans la littérature (Lovell *et al.*, 2004 ; Morais *et al.*, 2015). Après 80 heures, les bâches sont retirées et les plantules sont arrosées régulièrement.

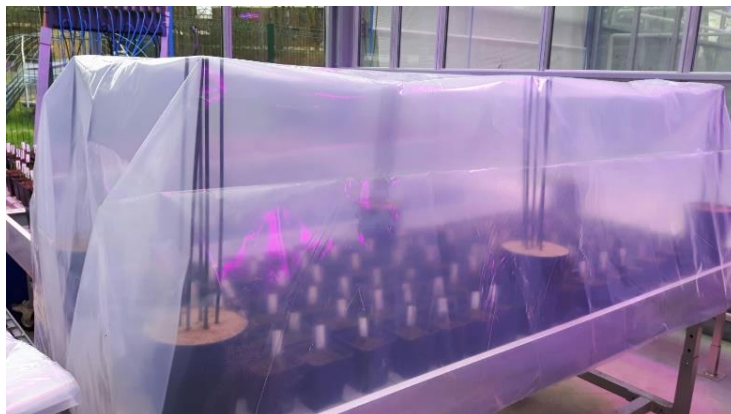


Figure 14 : Table de culture recouverte d'une bâche utilisée lors de ce mémoire afin d'atteindre une humidité relative maximale à l'intérieur de celle-ci pendant minimum 72 heures pour favoriser l'infection du blé par *Z. tritici*.

3.4.4 Evaluation du développement de la maladie

Différents critères d'évaluation ont été choisis de façon à pouvoir faire des comparaisons claires sur le développement de la maladie. Deux catégories de critères ont été mises en place. La première catégorie se base sur la rapidité de développement de la maladie. En effet, il est possible d'évaluer la capacité d'une souche à infecter le blé en observant la période d'incubation et de latence de la maladie. La période d'incubation est définie comme l'intervalle entre l'inoculation et l'apparition des premiers symptômes qui dans ce cas sont typiquement des jaunissements suivis de nécroses. La période de latence est définie comme l'intervalle entre l'inoculation et l'apparition des premières fructifications faisant référence ici à des pycnides. Pour évaluer ceci, une cotation binaire est effectuée à chaque observation (0=absence, 1=présence) dès le cinquième jour suivant l'inoculation.

La deuxième catégorie se base sur l'aspect quantitatif de la maladie et consiste à évaluer si la maladie induite par une souche de *Z. tritici* persiste au fur et à mesure que la plante se développe. En d'autres mots, l'objectif est d'analyser si la souche a pour but de coloniser l'entièreté de la feuille et si elle est capable de se reproduire aisément. Pour évaluer ceci, une échelle de cotation est établie avec pour but d'analyser la surface des symptômes (%) et la surface de sporulation (%) ayant recouvert la zone délimitée sur chaque feuille. Cette observation repose sur des pourcentages de surface observés à l'œil nu et débute une fois que la quasi-totalité des feuilles inoculées présente les symptômes caractéristiques de la septoriose.

4. RESULTATS

Dans le cadre de ce mémoire, un isolement monoconidien a été réalisé sur des souches de *Z. tritici* de 2017 provenant de Thy-le-Château. Au total, 201 souches ont été mises en collection avec un nombre total de 53, 53, 44 et 51 souches prélevées et isolées à partir des traitements TE (témoin), T1, T2 et T3 respectivement. Celles-ci sont reprises dans l'annexe 6. Notons que la numérotation des souches diffère entre les différentes collections de souches : (a) pour les souches de 2008-2009 (Ex. 10/08 = '10' : numéro de souche ; '08' : année d'isolement (2008)), (b) pour les souches de 2016 (Ex. 16T3T20 = '16' : année d'isolement (2016) ; 'T3' : traitement (3) ; 'T' : champ de prélèvement (Thy-le-Château) ; '20' : numéro de souche), (c) pour les souches de 2017 (Ex. 17TET7 rep2 = '17' : année d'isolement (2017) ; 'TE' : traitement (témoin) ; 'T' : champ de prélèvement (Thy-le-Château) ; '7' : numéro de souche ; rep2 : numéro de répétition (répétition 2)).

4.1 Analyse des essais réalisés sur deux champs belges durant les saisons culturales 2015-2016 et 2016-2017

Des essais fongicides pour lutter contre la septoriose ont été réalisés en champ à Ath et à Thy-le-Château en 2016 et 2017 par le Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W). Il nous est apparu intéressant de présenter, dans le cadre de ce travail, la sévérité de la maladie observée en relation avec ces traitements dans la mesure où cette information nous informe sur l'efficacité des traitements sur la maladie et sur les rendements, afin d'être en mesure de conseiller les agriculteurs.

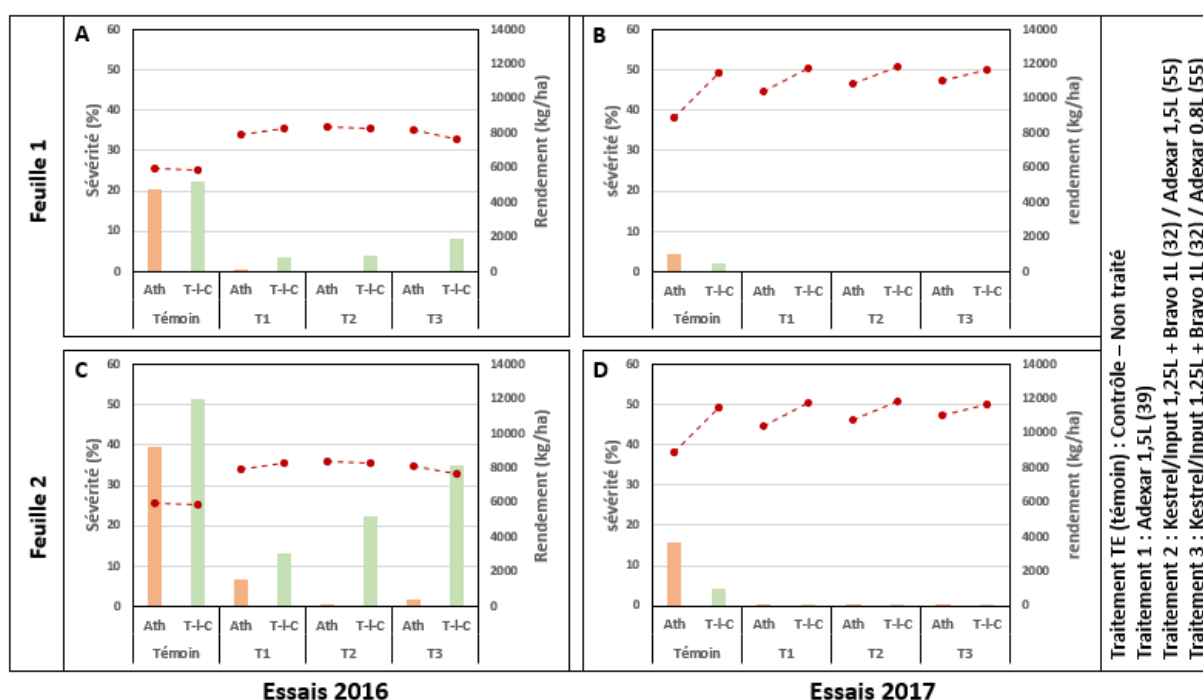


Figure 15 : Sévérité (pourcentage de la surface foliaire atteinte) de la septoriose observée à Ath et à Thy-le-Château en 2016 (A et C) et en 2017 (B et D) en fonction du traitement fongicide (témoin, T1, T2 et T3) appliqué durant la saison culturale respective. La sévérité a été cotée sur la F1 (A et B) et F2 (C et D) d'un nombre déterminé de plantes issues des différentes parcelles traitées ou non traitées. En rouge, l'évolution du rendement (kg/ha) sur les deux années consécutives par rapport à chaque champ et chaque traitement fongicide.

De manière générale, les essais des deux années ont montré des résultats divergents que ce soit au niveau de la pression de la maladie, exprimée par la sévérité (%), ou au niveau du rendement (kg/ha) (cf. figure 15). En ce qui concerne la sévérité, les résultats montrent que la pression de la maladie sur le blé a été plus élevée en 2016 qu'en 2017 quel que soit le lieu d'observation. Au niveau des plantes non traitées, la sévérité a dépassé les 50% à Thy-le-Château en 2016, or elle n'a même pas dépassé les 16% en 2017. En ce qui concerne le rendement, celui-ci est nettement plus élevé en 2017 qu'en 2016, quels que soient le traitement ou la localisation. Un lien peut être établi avec la pression de la septoriose, plus grande en 2016 qu'en 2017, indiquant que plus celle-ci est forte, moins le rendement est

élevé.

Après avoir analysé les essais de manière plus approfondie, plusieurs phénomènes sont observés. Au niveau de la sévérité, elle est plus élevée en 2016 à Thy-le-Château qu'à Ath, mais il convient de préciser que la cotation a été faite huit jours plus tard à Thy-le-Château. Ce laps de temps peut être responsable d'un léger biais ou sous-estimation de la pression à Thy-le-Château comparativement à Ath. Par contre, en 2017, la sévérité est plus élevée à Ath qu'à Thy-le-Château. Les mêmes facteurs explicatifs que ceux pour 2016 entrent en ligne de compte mais pas forcément de la même manière. Ceci sera développé ultérieurement dans la discussion.

Au niveau des traitements fongicides, les effets de ceux-ci sur la sévérité et le rendement sont fort différents entre les deux années et entre les deux champs au sein d'une même année. Comme visible sur la figure 15, les rendements sont plus faibles en 2016 alors que la pression de la maladie était plus forte. Lorsqu'un traitement quelconque a été appliqué, ce rendement est passé d'environ 6000 kg/ha à environ 8000 kg/ha, que ce soit à Ath ou à Thy-le-Château. Ainsi, le fait d'avoir appliqué un traitement a bien eu un effet sur le rendement en 2016. En effet, lorsqu'on observe l'effet de chaque traitement séparément, on constate que le traitement T3 ne semble pas avoir aussi bien contrôlé la maladie à Thy-le-Château que les traitements T1 et T2 ce qui s'est traduit par une sévérité plus forte et finalement par un rendement plus faible. En 2017, la situation observée n'est pas la même qu'en 2016. La pression étant nettement plus faible, les rendements se sont montrés plus élevés qu'en 2016. Entre les deux champs, la maladie n'a pas eu le même impact sur le rendement. A Thy-le-Château, ce dernier est resté aux alentours de 11000-12000 kg/ha même quand aucun traitement n'a été appliqué montrant ainsi un niveau de rendement constant avec ou sans traitement fongicide. Par contre, à Ath, le niveau du rendement s'est montré beaucoup plus sensible aux traitements fongicides car on observe une nette évolution du rendement passant de moins de 9000 kg/ha à environ 10000-11000 kg/ha lorsqu'un traitement quelconque a été appliqué

La pression de la septoriose est en relation inverse avec le rendement quel que soit le lieu d'observation avec un rendement plus faible lorsque la pression est plus forte. En effet, sur les deux années, les rendements les plus bas ont été obtenus lorsque aucun traitement n'a été appliqué. Une fois un traitement effectué, la sévérité a diminué et le rendement a augmenté.

4.2 Résultats de la caractérisation *in vitro* de la sensibilité des souches de *Z. tritici* aux triazoles sur base des EC₅₀ en plaque multipuits

Au total, 306 souches belges de *Z. tritici* ont été caractérisées *in vitro* au niveau de leur sensibilité aux triazoles. Les valeurs d'EC₅₀ obtenues sont reprises dans l'annexe 7. Les souches de 2008, 2009 et 2016 étaient déjà en collection au sein de l'unité de phytopathologie tandis que celles de 2017 (n=328 (201 de Thy-le-Château et 127 de Ath)) ont été isolées durant cette étude, en collaboration avec Alice Nysten.

Les résultats obtenus sont analysés de la même façon selon qu'il s'agit de la caractérisation *in vitro* de la sensibilité des souches de *Z. tritici* au prothioconazole ou au tébuconazole. Au niveau de l'analyse statistique, deux modèles ANOVA ont été utilisés. Un modèle ANOVA à un facteur de variabilité (année d'isolement=year) pour analyser les résultats d'EC₅₀ des souches témoins de 2008 à 2017 et un modèle ANOVA à trois facteurs (année d'isolement=year, lieu de récolte=site, type de traitement=treatments) en plan factoriel complet pour analyser les résultats d'EC₅₀ des souches de 2016 et de 2017. Ce modèle factoriel complet, basé sur une analyse de la variance à plusieurs facteurs, a été mis en place afin de tester l'effet d'interaction entre les différents paramètres. Les résultats de l'analyse statistique sont repris dans l'annexe 8.

4.2.1 Evolution de la résistance des souches de *Z. tritici* isolées entre 2008 et 2017

Les résultats obtenus pour les souches isolées en 2008 et 2009 récoltées à partir de champs non traités ont été comparés avec ceux obtenus pour les souches de 2016 et de 2017 isolées des parcelles non traitées de Ath et de Thy-le-Château (cf. figure 16). Le comportement de ces souches témoigne du niveau de sensibilité de la population sans pression à court terme de traitements fongicides.

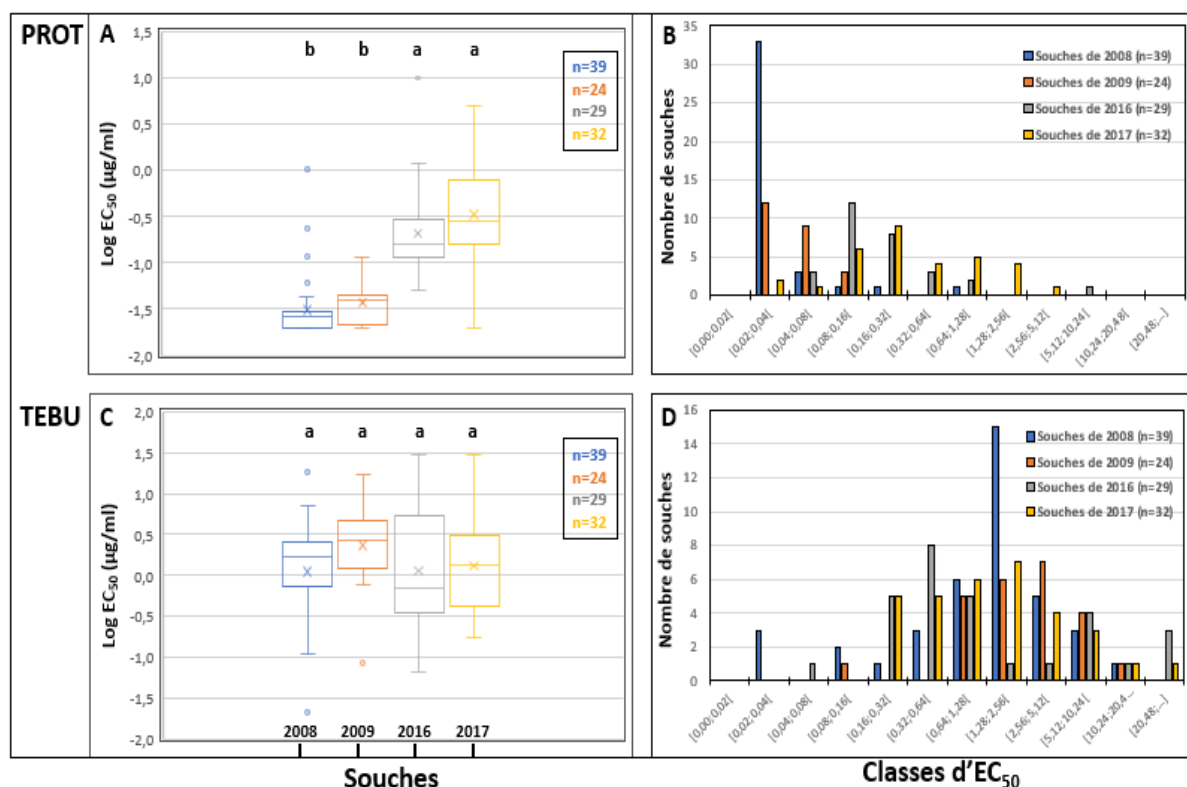


Figure 16 : Evolution de la résistance des souches de *Z. tritici* isolées en Belgique entre 2008 et 2017 face au prothioconazole (A et B) et au tébuconazole (C et D). (A) et (C) : Diagrammes en boîte à moustaches (box-plot) comparant la tendance des valeurs $\log d'EC_{50}$ (µg/ml) obtenues pour les populations de souches de *Z. tritici* de 2008 (n=39), 2009 (n=24), 2016 (n=29) et 2017 (n=32) face au prothioconazole (A) et au tébuconazole (C). (B) et (D) : Histogrammes en bâtons illustrant la distribution de la sensibilité de *Z. tritici* face au prothioconazole (B) et au tébuconazole (D) en termes du nombre de souches associé à chaque classe d' EC_{50} (mg/l) et ceci en fonction des quatre années de récolte 2008 (n=39), 2009 (n=24), 2016 (n=29) et 2017 (n=32).

Les deux graphiques de gauche (A et C) permettent de comparer la distribution d'une variable quantitative, dans ce cas les valeurs $\log d'EC_{50}$, entre diverses populations, notamment les quatre populations belges de souches de *Z. tritici* isolées à quatre moments différents, indépendamment du champ d'origine. Une analyse de la variance a été effectuée pour chaque matière active avec l'année d'isolement comme unique facteur de variabilité du test. En ce qui concerne le prothioconazole (A), les quatre diagrammes en boîte à moustaches illustrent des tendances fortement différentes entre les populations. En effet, le facteur 'année d'isolement' s'est révélé très significatif ($P < 0.001$) indiquant ainsi une différence significative de la sensibilité des souches au prothioconazole entre les années d'isolement. Un test de Tukey est venu corroborer ces résultats. Des moyennes de valeurs $\log d'EC_{50}$ égales à -1.506, -1.427, -0.683, -0.477 µg/ml ont été obtenues pour les années 2008, 2009, 2016 et 2017 respectivement permettant ainsi de distinguer deux classes de sensibilité (a et b) parmi ces quatre niveaux, comme visible sur la figure 16A. Ainsi, la classe de souches 'a' montre une sensibilité plus élevée en moyenne au prothioconazole que la classe de souches 'b'.

En ce qui concerne le tébuconazole (C), les quatre diagrammes en boîte à moustaches

affichent des valeurs similaires entre les populations car les moyennes observées, c'est-à-dire 0.044, 0.364, 0.054 et 0.116 µg/ml pour les années 2008, 2009, 2016 et 2017 respectivement, sont proches les unes des autres. Ceci est confirmé par l'analyse statistique. En effet, le facteur 'année d'isolement' n'est pas significatif ($P = 0.621$) indiquant que la différence de sensibilité des souches n'est pas significativement différente entre les années d'isolement. La sensibilité des souches de *Z. tritici* au tébuconazole n'a donc pas évolué entre les années, avec la valeur moyenne la plus élevée observée pour les souches isolées en 2009.

Les deux graphiques de droite (B et D) décrivent des phénomènes similaires à ceux ayant été observés dans les diagrammes en boîte à moustaches cependant d'une manière nettement plus visuelle car ils illustrent le nombre de souches associé à chaque classe d'EC₅₀ en fonction de l'année d'isolement de celles-ci. Concernant le prothioconazole (B), la grande majorité des souches isolées en 2008 et la totalité de celles isolées en 2009 sont associées à des classes faibles d'EC₅₀ avec des valeurs allant de 0.02 à 0.16 mg/l. Seulement deux souches de 2008 présentent des valeurs d'EC₅₀ associées à une classe d'EC₅₀ plus élevée. Pour les souches de 2016 et de 2017, les valeurs d'EC₅₀ sont plus élevées. En effet, la majorité des souches isolées lors de ces deux années sont associées à des classes d'EC₅₀ allant de 0.08 à 2.56 mg/l tandis que seulement trois souches de chaque année se sont trouvées dans une classe de valeurs inférieures et une souche de chaque année dans une classe de valeurs supérieures. Concernant le tébuconazole (D), les souches des quatre années d'isolement présentent des valeurs d'EC₅₀ nettement supérieures à celles observées dans le cas du prothioconazole mis à part quelques exceptions. Ces valeurs appartiennent, pour la plus grande majorité d'entre-elles, à des classes d'EC₅₀ allant de 0.16 à 10.24 mg/l et ceci pour les quatre groupes de souches.

L'évolution de la résistance des populations de souches, isolées sur quatre années à partir de champs belges non traités, a pris des allures complètement différentes selon la matière active analysée. Pour le prothioconazole, deux classes de populations sont identifiées sur base de leurs valeurs log d'EC₅₀. Ainsi, les souches isolées lors de la période 2008-2009 montrent une sensibilité plus forte à la matière active que les souches isolées lors de la période 2016-2017. Dans le cas du tébuconazole, aucune distinction significative n'est constatée entre les groupes de souches. Ainsi, les souches isolées sur les quatre années montrent des comportements similaires face à la matière active. Les histogrammes en bâtons montrent les mêmes résultats.

4.2.2 Evolution de la résistance des souches de *Z. tritici* isolées entre 2016 et 2017

Comme expliqué préalablement, les souches de 2016 et 2017 ont été récoltées à partir de deux champs belges, notamment de Ath et de Thy-le-Château. Chaque champ a été divisé en

de multiples micro-parcelles de taille identique (2m x 10-13m) et quatre traitements fongicides, ayant chacun été appliqué sur quatre micro-parcelles réparties aléatoirement dans le champ, ont été sélectionnés pour cette étude. Ces traitements étaient identiques quels que soient l'année et le champ. Ainsi, comme plusieurs facteurs sont entrés en jeu durant ces deux années culturales, il a été possible d'analyser l'effet de chacun d'entre eux sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici* en Belgique et d'évaluer les interactions qui ont eu lieu entre ces facteurs.

4.2.2.1 Effet du lieu de récolte et de l'année d'isolement

Pour évaluer séparément l'effet du lieu de récolte et de l'année d'isolement, les valeurs d'EC₅₀ obtenues pour les souches issues des deux champs et des deux années ont été regroupées et étudiées (cf. figure 17).

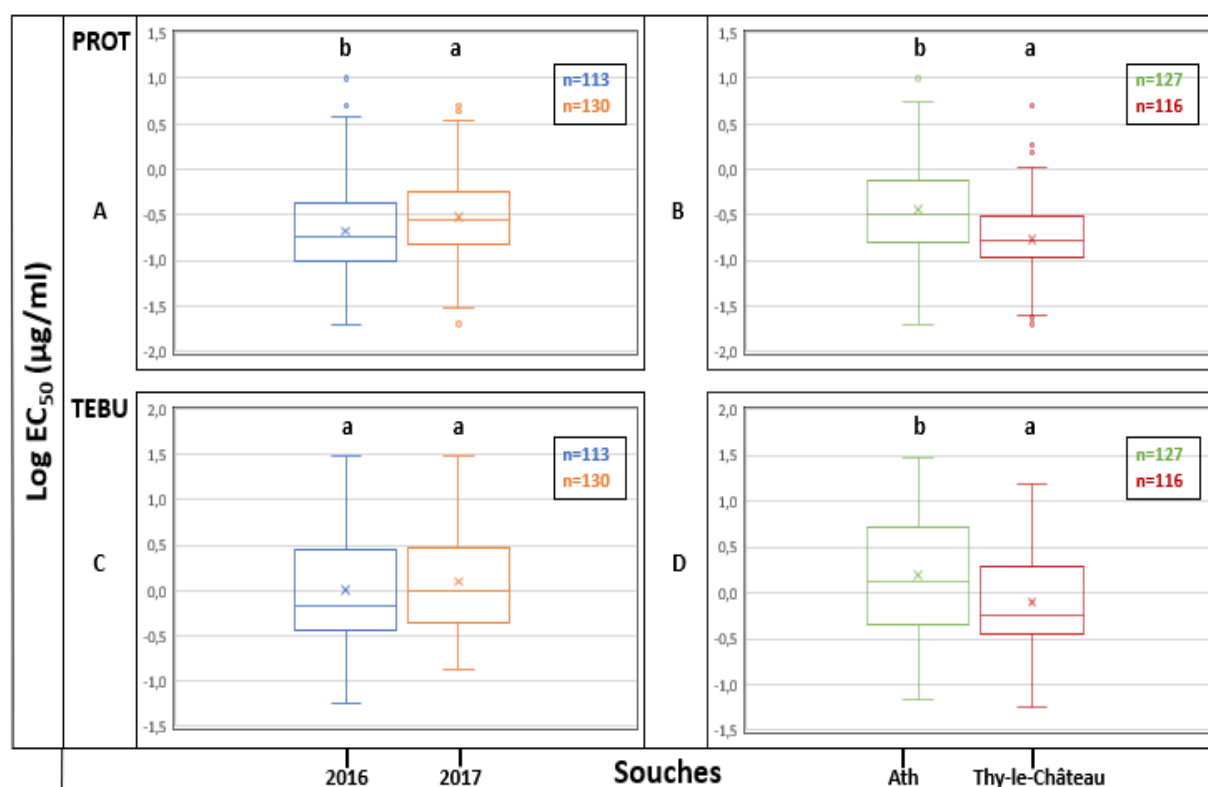


Figure 17 : Evolution de la résistance des souches de *Z. tritici* récoltées et isolées entre 2016 et 2017 à partir de deux champs belges (Ath et Thy-le-Château) face au prothioconazole (A et B) et au tébuconazole (C et D). (A) et (C) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d'EC₅₀ (µg/ml) obtenues pour les populations de souches de 2016 (n=113) et de 2017 (n=130) face au prothioconazole (A) et au tébuconazole (C) au niveau des deux champs. (B) et (D) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d'EC₅₀ (µg/ml) obtenues pour les populations de souches de Ath (n=127) et de Thy-le-Château (n=116) face au prothioconazole (B) et au tébuconazole (D) au niveau des deux années de récolte.

Les deux graphiques de gauche (A et C) décrivent la distribution de la sensibilité des souches de *Z. tritici* en Belgique entre 2016 et 2017 au niveau des deux champs. Dans le cas du prothioconazole, les deux diagrammes en boîte à moustaches (A) illustrent des tendances

légèrement différentes entre les deux populations de souches, avec une sensibilité moyenne plus faible en 2017. En effet, l'analyse statistique a révélé que le facteur 'année d'isolement' est significatif ($P < 0.01$) indiquant qu'il existe une différence significative de la sensibilité des souches entre les deux années d'isolement. De plus, le test de Tukey indique que les moyennes, c'est-à-dire -0.676 et -0.526 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches isolées en 2016 et 2017 respectivement, appartiennent à deux classes de sensibilité différentes (a et b) (cf. figure 17A). Ainsi, la population de souches de 2017 montre une résistance moyenne plus grande que la population de souches de 2016. En ce qui concerne le tébuconazole, les tendances décrites par les deux diagrammes en boîte à moustaches (C) sont très proches. Statistiquement, ce même facteur de variabilité n'est pas significatif ($P = 0.086$). Les moyennes obtenues, notamment 0.004 et 0.100 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches isolées 2016 et 2017 respectivement, sont suffisamment proches d'un point de vue statistique pour pouvoir regrouper les deux populations de souches dans une même classe de sensibilité (a) (cf. figure 17C).

Les deux graphiques de droite (B et D) permettent de comparer, sur une même période, la distribution de la sensibilité des souches de *Z. tritici* en fonction de deux champs belges distincts. Pour le prothioconazole, les deux diagrammes en boîte à moustaches (B) décrivent des tendances nettement différentes entre les populations de souches issues des deux sites belges, avec une sensibilité moyenne plus faible à Ath. Dans le cas du tébuconazole (D), un raisonnement identique peut être établi. Pour les deux matières actives, le facteur 'lieu de récolte' s'est révélé très significatif ($P < 0.001$) montrant ainsi une différence significative de la sensibilité des souches entre les deux lieux de récolte. Les moyennes des valeurs log d' EC_{50} , étant égales à -0.433 et -0.733 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches récoltées à Ath et à Thy-le-Château respectivement dans le cas du prothioconazole et égales à 0.198 et -0.102 $\mu\text{g/ml}$ pour les souches récoltées à Ath et à Thy-le-Château respectivement dans le cas du tébuconazole, permettent de classer les deux populations de souches dans deux classes de sensibilité (a et b) par rapport au lieu de récolte (cf. figure 17B-17D). Ainsi, le niveau de résistance aux deux triazoles des souches isolées dans le champ à Ath est supérieur à celui des souches provenant du champ à Thy-le-Château.

L'analyse des résultats a permis de révéler plusieurs choses. Tout d'abord, selon qu'il s'agit d'une différence entre l'année d'isolement ou entre le lieu de récolte, les résultats des tests de sensibilité des souches au prothioconazole ont toujours montré des valeurs d' EC_{50} inférieures à celles obtenues dans le cas du tébuconazole.

Deuxièmement, dans le cas du prothioconazole, l'effet de l'année d'isolement est suffisamment important pour expliquer d'une manière significative une partie de la différence

de sensibilité entre les souches de 2016 et de 2017 provenant de deux champs. Ainsi, les souches isolées en 2017 ont été classifiées plus résistantes en moyenne que les souches isolées en 2016 traduisant une évolution de la résistance des souches. Cependant, ceci n'était pas le cas lors de l'analyse précédente sur les souches isolées de champs non traités où les souches de 2016 et 2017 étaient regroupées au sein d'une seule classe de sensibilité (a) (cf. section 4.2.1). Concernant le tébuconazole, les deux populations de souches sont associées à une même classe de sensibilité. Enfin, le lieu de récolte a également eu un effet significatif sur la sensibilité des souches des deux années et ceci pour les deux triazoles. En effet, la population de Ath et celle de Thy-le-Château ont été regroupées dans deux classes différentes selon leur sensibilité avec une présence de souches plus résistantes en moyenne à Ath qu'à Thy-le-Château et ceci dans le cas des deux triazoles.

4.2.2.2 Effet du traitement fongicide et influence des interactions entre l'année d'isolement, le lieu de récolte et le type de traitement sur l'évolution de la résistance des souches de *Z. tritici*

Résultats associés au prothioconazole

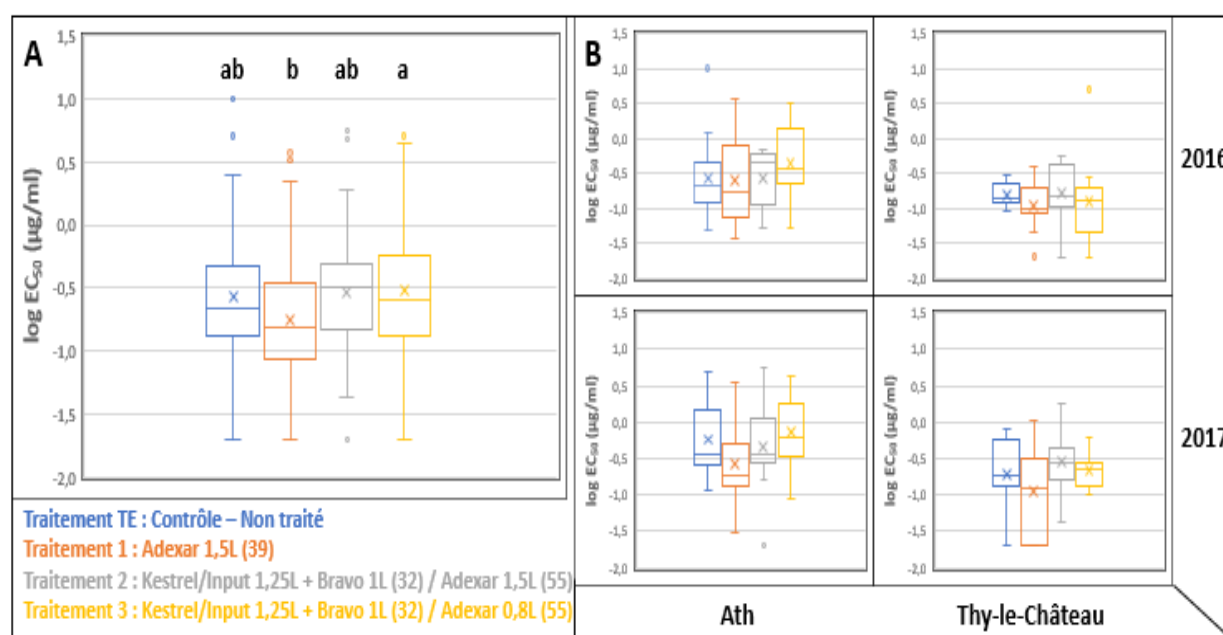


Figure 18 : Evolution de la résistance des souches de *Z. tritici* récoltées entre 2016 et 2017 face au prothioconazole en fonction du traitement fongicide imposé. (A) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant l'effet global de chaque traitement fongicide sur le comportement de *Z. tritici* en Belgique entre 2016 et 2017 (B) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d'EC₅₀ (µg/ml) obtenues pour les diverses populations de souches en fonction du traitement fongicide et de l'interaction existante avec l'année d'isolement et le lieu de récolte des souches.

Dans le graphique de gauche (A), les quatre diagrammes en boîte à moustaches montrent des tendances différentes selon le type de traitement appliqué. En effet, l'analyse statistique a révélé que le facteur 'type de traitement' est significatif ($P < 0.05$) indiquant qu'il existe une

différence significative de la sensibilité des souches récoltées entre 2016 et 2017 selon le type de traitement appliqué durant la saison culturale. Un test de Tukey a ensuite permis de classer les niveaux du facteur selon leur moyenne. Ces dernières étant égales à -0.575, -0.754, -0.533 et -0.519 $\mu\text{g/ml}$ pour les traitements TE (témoin), T1, T2 et T3 respectivement, deux classes de sensibilité (a et b) sont identifiées parmi les quatre niveaux, comme visible sur la figure 18A. La classe 'ab' n'est pas considérée comme étant une classe de sensibilité distincte car elle n'est pas statistiquement différente des deux autres classes. Ainsi, les valeurs log d'EC₅₀ et donc la résistance des souches isolées de feuilles traitées avec le traitement T1 (Adexar (GS39) : époxiconazole + fluxapyroxad) sont statistiquement plus faibles en moyenne que les valeurs log d'EC₅₀ et donc la résistance des souches isolées de feuilles traitées avec le traitement T3 (Kestrel ou Input (GS32) : prothioconazole + tébuconazole ou prothioconazole + spiroxamine ; Bravo (GS32) : chlorothalonil ; Adexar (GS55) : époxiconazole et fluxapyroxad).

Les graphiques de droite (B) illustrent l'effet de l'interaction entre les différents paramètres étudiés, c'est-à-dire l'année d'isolement, le lieu de récolte et le type de traitement, sur l'évolution du comportement de *Z. tritici* face au prothioconazole en Belgique sur les deux années. De manière générale, quels que soient l'année de récolte ou le lieu de récolte, le traitement T1 est à chaque fois associé à des souches plus sensibles en moyenne que les trois autres traitements, comme déjà constaté durant l'analyse globale (A). En revanche, nous constatons que le traitement T3 est associé aux souches les plus résistantes en moyenne à Ath mais pas à Thy-le-Château. Il n'est donc pas toujours associé aux souches les plus résistantes comme c'était le cas lors de l'analyse globale. Une fois la situation analysée de plus près, plusieurs choses sont constatées. Ainsi, le facteur 'lieu de récolte' semble avoir une influence sur l'effet des traitements, notamment sur celui du traitement T3 associé, sur les deux années, aux souches les plus résistantes en moyenne à Ath. L'inverse est observé au niveau du traitement T2 (Kestrel ou Input (GS32) : prothioconazole + tébuconazole ou prothioconazole + spiroxamine ; Bravo (GS32) : chlorothalonil ; Adexar (GS55) : époxiconazole et fluxapyroxad) qui est associé, sur les deux années, aux souches les plus résistantes en moyenne à Thy-le-Château. Ainsi, il se peut qu'un traitement gagne ou perde en efficacité selon l'endroit où il a été appliqué. Quant au facteur 'année d'isolement', il ne semble pas avoir eu une influence sur l'effet des traitements car de mêmes tendances sont observées sur les deux années. Statistiquement, aucune interaction, que ce soit une double ou une triple, ne s'est révélée être significative indiquant que, malgré les différences visuelles observées durant l'étude, il n'y a d'interaction significative entre les trois facteurs.

Résultats associés au tébuconazole

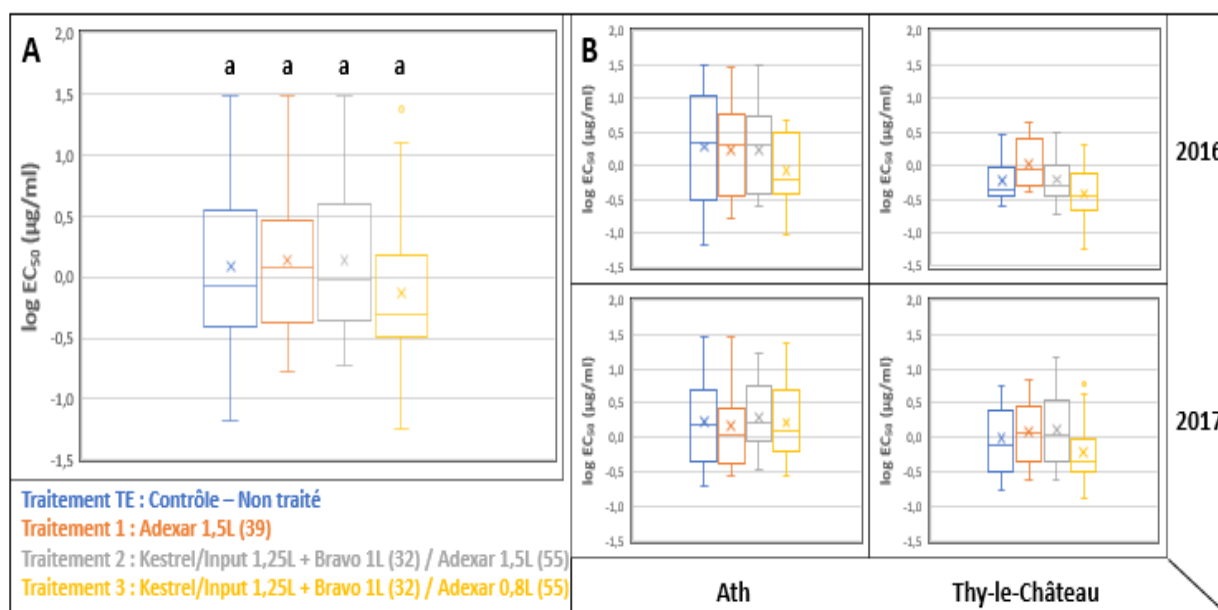


Figure 19 : Evolution de la résistance des souches de *Z. tritici* récoltées entre 2016 et 2017 face au tébuconazole en fonction du traitement fongicide imposé. (A) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant l'effet global de chaque traitement fongicide sur le comportement de *Z. tritici* en Belgique entre 2016 et 2017 (B) : Diagrammes en boîte à moustaches comparant la tendance des valeurs log d'EC₅₀ (µg/ml) obtenues pour les diverses populations de souches en fonction du traitement fongicide et de l'interaction existante avec l'année d'isolement et le lieu de récolte des souches.

Les quatre diagrammes en boîte à moustaches, présentés dans le graphique de gauche (A), montrent des tendances différentes selon le type de traitement appliqué. Comme dans le cas du prothioconazole, l'analyse statistique a montré que le facteur 'type de traitement' est significatif ($P < 0.05$) indiquant une différence significative de la sensibilité des souches récoltées entre 2016 et 2017 selon le type de traitement appliqué durant la saison culturale. En revanche, nous observons que les moyennes obtenues, notamment 0.086, 0.131, 0.134 et -0.125 µg/ml pour les souches soumises aux traitements TE (témoin), T1, T2 et T3 respectivement, sont suffisamment proches entre elles d'un point de vue statistique selon le test de Tukey. Cela permet de regrouper les quatre groupes de souches dans une même classe de sensibilité (a) (cf. figure 19A). Ainsi, aucun traitement n'a eu un effet statistiquement plus important qu'un autre sur l'évolution de la résistance chez *Z. tritici* malgré que l'analyse de la variance ait confirmé que le choix du traitement aurait bel et bien un rôle à jouer dans cette évolution.

Les graphiques de droite (B) présentent l'effet de l'interaction entre les différents paramètres étudiés sur l'évolution du comportement de *Z. tritici* en Belgique face au tébuconazole sur les deux années. Comme constaté durant l'analyse globale (A), les souches prélevées de feuilles traitées avec le traitement T3 s'avèrent en moyenne plus sensibles au tébuconazole que les

souches issues de feuilles traitées avec les autres traitements sauf à Ath en 2017 où c'est le traitement T1 qui semble être associé aux souches les plus sensibles en moyenne. Les diagrammes en boîte à moustaches ne décrivent pas les mêmes tendances selon le lieu de récolte et l'année d'isolement. En effet, entre Ath 2017 et Thy-le-Château 2016, les divers traitements semblent avoir des effets différents sur l'évolution de la résistance chez *Z. tritici*. Les souches les plus résistantes en moyenne à Thy-le-Château en 2016 sont associées au traitement T1, or le cas inverse est observé à Ath en 2017. Ces résultats montrent qu'il existerait des interactions entre ces facteurs et que l'effet d'un traitement peut être influencé par l'endroit où il a été appliqué et/ou l'année durant laquelle il a été appliqué. Cependant, aucune interaction double ou triple ne s'est révélée être significative indiquant que, malgré les différences visuelles observées durant l'étude, il n'y a d'interaction significative entre les trois facteurs.

L'analyse des résultats a permis de constater plusieurs choses. Concernant le prothioconazole, le traitement T1, c'est-à-dire l'association de l'époxiconazole à du fluxapyroxad (SDHI), est associé aux souches les plus sensibles en moyenne. Cependant, entre les traitements T2 et T3, la demi dose d'Adexar a induit une très légère augmentation de la résistance chez *Z. tritici*. Il semblerait donc que l'époxiconazole, apporté en combinaison avec un SDHI, atténue l'évolution de la résistance chez *Z. tritici* lorsqu'il est le seul triazole à avoir été appliqué sur l'agent pathogène. En revanche, l'effet de l'Adexar semble être inversé une fois que d'autres triazoles, notamment le tébuconazole et le prothioconazole, sont déjà appliqués sur la culture (cf. figure 18). Concernant le tébuconazole, les valeurs log d'EC₅₀ élevées laissent croire que des mécanismes de résistance face au tébuconazole étaient déjà présents au sein des populations de *Z. tritici* en Belgique contrairement au prothioconazole, introduit plus tardivement. En effet, en observant les traitements T1 et T2, il apparaît que l'ajout de tébuconazole (Kestrel) n'a pas eu d'impact significatif sur la différence de sensibilité des souches face à la matière active. Ces résultats concorderaient avec ce qui a été suggéré lors des études précédentes. Le traitement T3 est associé aux souches les plus sensibles en moyenne. Cette hypothèse n'a cependant pas pu être confirmée par l'analyse statistique bien que visuellement il est fort probable que cela était le cas. Aucun traitement n'aurait donc eu un effet significativement plus important qu'un autre sur l'évolution de la résistance chez *Z. tritici*. En revanche, l'Adexar aurait eu un effet inverse que dans le cas du prothioconazole. Lorsque celui-ci était appliqué à une dose complète, que ce soit seul (T1) ou avec un traitement préalable (T2), les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés. En revanche, la demi dose d'Adexar (T3) a induit la sélection des souches les plus sensibles en moyenne même lorsqu'un traitement au Kestrel était effectué préalablement (cf. figure 19).

4.2.3 Résistance croisée entre le prothioconazole et le tébuconazole

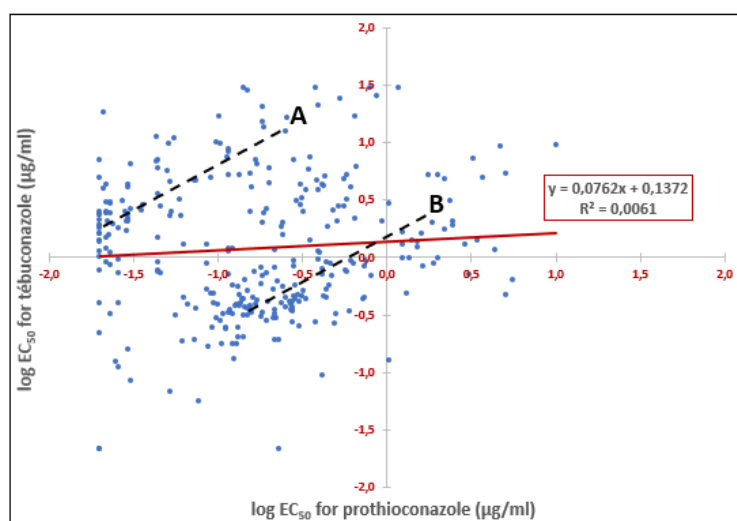


Figure 20 : Résistance croisée entre le prothioconazole et le tébuconazole évaluée sur un total de 306 souches belges de *Z. tritici* isolées entre 2008 et 2017.

La figure 20 représente pour l'ensemble des 306 souches belges testées les valeurs des EC_{50} observées pour le prothioconazole et le tébuconazole. A première vue, la dispersion des points autour des axes ne permet pas de mettre en évidence une corrélation claire, et donc une résistance croisée entre les valeurs observées pour les deux triazoles. L'analyse statistique confirme d'ailleurs que cette corrélation n'est pas significative ($P = 0.173$). Une analyse plus fine de la distribution des points permet néanmoins de distinguer deux groupes d'individus au sein des populations de *Z. tritici* en Belgique entre 2008 et 2017. Un premier groupe (A) semble regrouper des individus ayant un certain niveau de résistance face aux deux triazoles. Quant au deuxième groupe (B), les individus montrent une même tendance de résistance que les individus du premier groupe mais avec un niveau de résistance plus élevé face au prothioconazole et légèrement plus faible face au tébuconazole.

4.3 Résultats de la caractérisation moléculaire du gène CYP51 des souches de *Z. tritici*

Sur les 306 souches pour lesquelles la sensibilité aux triazoles a été caractérisée *in vitro*, 28 souches ont été sélectionnées et réparties, sur base de leurs valeurs d'EC₅₀, en deux classes de résistance face aux deux matières actives de la famille des DMIs. Ainsi, les souches ont été classifiées soit résistantes, soit sensibles au tébuconazole et au prothioconazole. La souche 16T2T22 a été retirée car elle n'a révélé aucune bande d'amplification après électrophorèse sur gel d'agarose, ce qui nous a laissé un total de 27 souches séquencées. Seulement deux souches parmi celles récoltées en 2008 et 2009 (10/08 et 126/09) ont été caractérisées moléculairement durant ce travail. En effet, les tests de sensibilité réalisés sur les souches de 2008 et 2009 ont révélé des niveaux de résistance faibles vis-à-vis des deux triazoles, en particulier face au prothioconazole. Dans un premier temps, une analyse des données moléculaires obtenues pour chaque souche séquencée a été réalisée afin de vérifier la qualité des séquences et de corriger les erreurs de séquençage. Ensuite, une observation plus détaillée a été effectuée au niveau de la séquence complète du gène CYP51 et les polymorphismes d'acides aminés de chaque souche ont été identifiés et comparés à ceux d'une souche sauvage de référence. Finalement, le lien génotype-phénotype caractéristique de chaque souche a été établi en fonction du génotype décrit précédemment (Leroux et Walker, 2011 ; Huf *et al.*, 2018) et du niveau de résistance.

4.3.1 Analyse des données moléculaires du gène CYP51 des souches de *Z. tritici*

Après avoir supprimé les parties excédantes de chaque séquence et avoir assemblé les trois séquences de chaque souche en un contig via le programme Sequencher® 4.8 (Gene Codes Corporation), le tableau de l'annexe 9 a pu être constitué. Celui-ci reprend les diverses données moléculaires obtenues durant l'étude dans le but d'évaluer la qualité de la séquence complète du gène CYP51 pour chacune des souches séquencées. L'assemblage des trois séquences nucléotidiques a pu être réalisé pour 20 souches sur les 27 séquencées durant ce travail. Pour les sept souches restantes, un alignement complet n'a pas pu être effectué dû à un manque de qualité au niveau d'une des trois séquences nucléotidiques ou à un séquençage incomplet. Les séquences nucléotidiques, complètes ou non complètes, des souches de 2008-2009, 2016 et 2017 sont reprises dans l'annexe 10.

4.3.2 Observations des polymorphismes d'acides aminés du gène CYP51 des souches de *Z. tritici*

Après avoir formé un contig par l'assemblage des trois séquences nucléotidiques obtenues pour chacune des souches séquencées, la séquence nucléotidique complète a été alignée sur la séquence référence (Mycgr3G110231 ; www.fungi.ensemble.org) du gène CYP51 de la souche sensible IPO323 dans le programme Ugene afin de ne conserver que la partie codante du gène. Cette séquence ainsi obtenue a ensuite pu être traduite en une séquence d'acides aminés correspondante. Le programme Ugene a permis de comparer la séquence d'acides aminés de la souche wild-type à celle de la souche étudiée. Ainsi, il a été possible d'observer les différentes mutations associées à la séquence d'acides aminés étudiée. Après avoir observé les polymorphismes d'acides aminés de toutes nos souches, le tableau 6 a pu être mis en place. Comme expliqué dans la section précédente, le séquençage n'a pas toujours donné des résultats satisfaisants. De ce fait, l'alignement des trois séquences nucléotidiques n'a pas pu être effectué pour l'entièreté des souches (cf. annexe 9 et tableau 6). Pour cinq d'entre elles (10/08, 126/09, 16T1T14, 16T3T20 et 17T2A17 rep4), le problème venait d'une qualité trop faible de la deuxième séquence nucléotidique. En revanche, comme la première et la troisième séquence étaient de bonne qualité et de grande taille, la quasi-totalité de la séquence complète d'acides aminés a pu être observée. En ce qui concerne les trois autres souches (17T3A6 rep3, 17TEA3 rep1 et 17T2T3 rep3), il s'agissait soit d'un manque de qualité au niveau de la troisième séquence nucléotidique, soit de l'absence de séquençage. La totalité de la séquence d'acides aminés n'a donc pas pu être visualisée. Enfin, la séquence du gène CYP51 de la souche 17T1T6 rep1 n'a également pas pu être entièrement visualisée pour cause d'une faible qualité de la première séquence (F1), en particulier au niveau des nucléotides 1 à 366.

Tableau 6 : Les polymorphismes d'acides aminés et la position de ceux-ci dans le gène CYP51 de 27 souches de *Z. tritici* récoltées entre 2008 et 2017 en Belgique. Les souches ont été réparties selon leur catégorie de résistance face au tébuconazole et au prothioconazole et selon l'année de récolte. La fréquence de survenue d'une mutation à l'intérieur de chaque catégorie a été calculée. Les positions d'acides aminés en vert ont déjà été mentionnées dans la littérature (Cools *et al.*, 2013) tandis que celle marquée en orange fait référence à une nouvelle mutation découverte durant l'étude.

Catégorie + N° souches	EC ₅₀ Prot	EC ₅₀ Tébu	Position du polymorphisme d'acide aminé											
			L50	D134	V136	R177	S188	A379	I381	Y459 ¹	G460 ¹	Y461	N513	S524
Mycgr3G110231*			L	D	V	R	S	A	I	Y	G	Y	N	S
SENSIBLES														
10/08	0,119	0,348	L	G	A	R	N	A	I	/	/	Y	N	S
126/09	0,027	3,141	S	D	V	R	N	G	V	/	/	Y	K	S
16T1A2	0,485	2,580	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
16T1T14	0,202	4,379	S	D	A	R	N	A	I	/	/	Y	N	T
16T2A19	0,583	5,219	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
16T3A2	0,053	2,492	S	D	V	R	N	G	V	/	/	Y	K	S
16T3T19a	0,277	0,367	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
17T1A11 rep4	1,305	0,486	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
17T2A1 rep1	0,396	0,946	S	G	A	C	S	A	V	Y	G	H	N	S
17T2A5 rep2	0,396	3,895	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
17T2T5 rep2	0,387	4,705	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
17T2T3 rep3	0,430	5,016	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	-	-
17T3A5 rep2	0,419	0,701	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
17T3T1 rep2	0,427	4,175	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
RESISTANTES														
16TEA19	10,012	9,443	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
16T1A6	3,271	7,156	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	T
16T1A10	1,993	5,246	S	D	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	T
16T1A15	3,714	4,993	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	T
16T3A7	2,910	1,301	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	T
16T3T20	5,080	0,472	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
17TEA4 rep3	5,051	5,370	S	G	A	R	S	G	V	/	/	Y	N	T
17T1T6 rep1	1,040	2,926	-	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	T
17T2T6 rep3	1,854	1,992	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	T
17T2A17 rep4	4,741	9,121	S	D	C	R	N	G	V	/	/	Y	N	T
17T3A6 rep3	1,769	5,253	S	G	A	R	S	G	V	-	-	-	-	-
17T2A3 rep4	5,546	0,633	S	G	A	R	S	A	V	Y	G	H	N	S
17TEA3 rep1	0,790	30,000	S	D	C	R	N	-	-	-	-	-	-	-
Frequency (%) :														
→ Souches sensibles			92,9	78,6	85,7	7,14	28,6	14,3	85,7	28,6	28,6	71,4	15,4	7,69
→ Souches résistantes			100	76,9	100	0	15,4	25	100	18,2	18,2	81,8	0	72,7
- : Cette partie de la séquence d'acides aminés n'a pas pu être visualisée ou n'a pas été séquencée. * : Souche de type sauvage avec laquelle les séquence nucléotidiques et d'acides aminés ont été comparées. ¹ : Double délétion ΔY459/G460, fait référence à une mutation et non à deux. / : Absence de l'acide aminé à la position indiquée. Prot = prothioconazole Tébu = tébuconazole														

4.3.2.1 Observations des génotypes associés aux souches sensibles

L'analyse des séquences complètes du gène CYP51 des deux souches isolées en 2008-2009 a indiqué la présence de 8 mutations par rapport à la séquence complète de la souche sauvage de référence (Mycgr3G110231). La double délétion $\Delta Y459/G460$ et la mutation S188N ont été détectées dans les deux souches. En revanche, les résultats ont révélé des différences au niveau de six polymorphismes d'acides aminés, notamment aux positions L50, D134, V136, A379, I381 et N513 (cf. tableau 6). Concernant les cinq souches sensibles isolées en 2016, 10 mutations différentes ont été révélées au cours de l'expérience. La mutation L50S est la seule à avoir été identifiée dans la totalité des souches tandis que la mutation R177C n'a jamais été retrouvée. Les neuf autres mutations ont été révélées entre une et quatre fois à travers les cinq souches sensibles de 2016 (cf. tableau 6). Enfin, l'analyse des séquences complètes du gène CYP51 des sept souches sensibles isolées en 2017 a permis de détecter 6 mutations par rapport à la séquence complète de la souche sauvage de référence. Dans les sept souches, les substitutions L50S, D134G, V136A, I381V et Y461H ont été observées tandis que les substitutions S188N, A379G, $\Delta Y459/G460$, N513K et S524T n'ont jamais été identifiées. La mutation R177C a été révélée une seule fois et ceci pour la première fois dans la population totale étudiée. Ainsi, les sept souches sensibles affichent des profils génotypiques quasi totalement identiques, mis à part pour 17T2A1 rep1 contenant la nouvelle mutation en plus (cf. tableau 6). En tout, les 11 mutations ont été révélées à travers les 14 souches étudiées sur les quatre années cependant aucune des 11 mutations n'a été observée dans la totalité des souches de la catégorie (cf. tableau 6).

4.3.2.2 Observations des génotypes associés aux souches résistantes

L'analyse des séquences complètes du gène CYP51 des six souches isolées en 2016 a permis la détection de 6 mutations par rapport à la séquence complète de la souche sauvage de référence. Pour les six souches résistantes de 2016, les substitutions L50S, V136A, I381V et Y461H ont à chaque fois été retrouvées tandis que les substitutions R177C, S188N, A379G, $\Delta Y459/G460$ et N513K n'ont jamais été identifiées. Les deux mutations restantes, D134G et S524T, ont été révélées cinq et quatre fois respectivement (cf. tableau 6). En ce qui concerne les sept souches résistantes isolées en 2017, l'analyse des séquences complètes du gène CYP51 de celles-ci a permis d'identifier 9 mutations par rapport à la séquence complète de la souche sauvage de référence. Similairement aux souches de 2016 de la même catégorie, les mutations L50S, V136A/C et I381V sont survenues dans la totalité des souches de 2017. En revanche, seulement deux mutations n'ont pas été identifiées, notamment R177C et N513K. Parmi les autres, les substitutions D134G et S188N ont été détectées chez cinq et deux

souches de 2017 respectivement. La substitution A379G a été révélée trois fois sur six. Enfin, les mutations $\Delta Y459/G460$, Y461H et S524T ont été identifiées deux, trois et quatre fois respectivement et ceci dans cinq souches de 2017 pour lesquelles la partie respective de la séquence a pu être visualisée entièrement (cf. tableau 6). En tout, 9 mutations sur 11 ont été révélées à travers les 13 souches étudiées sur les deux années. Les polymorphismes d'acides aminés aux positions L50, V136 et I381 ont été observés dans la totalité des souches de la catégorie tandis que ceux aux positions R177 et N513 n'ont jamais été identifiés. Les souches résistantes isolées en 2017 sont pourvues de trois mutations supplémentaires (S188N, G379A et $\Delta Y459/G460$) que les souches isolées en 2016 (cf. tableau 6).

Au total, 11 mutations différentes ont été observées au sein du gène CYP51 à travers les populations belges de *Z. tritici* étudiées. La mutation S524T affiche la différence de fréquence de survenue (%) la plus grande entre les deux catégories de souches avec une fréquence de survenue de 72.7% chez les résistantes et de 7.69% chez les sensibles, soit une différence de 65.01%. La mutation L50S indique la différence de fréquence de survenue (%) la plus faible entre les deux catégories de souches avec une fréquence de survenue de 100% chez les résistantes et 92.9% chez les sensibles, soit une différence de 7.1%. En effet, la souche 10/08 est la seule souche à ne pas porter la mutation (cf. tableau 6).

4.3.3 Analyse de la relation phénotype-génotype des souches de *Z. tritici*

L'observation des polymorphismes d'acides aminés au sein du gène CYP51 a permis d'attribuer un génotype spécifique à chacune des souches séquencées. Les différentes combinaisons observées entre mutations ont été associées à des phénotypes de résistance préalablement décrits dans la littérature et caractérisant le niveau de résistance d'une souche face aux triazoles. En comparant nos résultats avec des données issues de recherches similaires telles que celles réalisées par Leroux et Walker en 2011 et Huf *et al.* en 2018, chaque souche s'est vu attribué un phénotype attendu spécifique en lien avec son génotype et son niveau de résistance. Ainsi, le tableau 7 a été construit. Celui-ci ne reprend que les souches pour lesquelles l'entièreté du gène CYP51 a pu être visualisée et donc pour lesquelles tous les codons pertinents pour cette étude ont pu être observés. Les souches 17T3A6 rep3, 17TEA3 rep1 et 17T2T3 rep3 n'ont donc pas été réparties dans une classe phénotypique quelconque.

Tableau 7 : Description des phénotypes et génotypes du gène CYP51 associés aux souches de *Z. tritici* isolées entre 2008 et 2017 et caractérisées moléculairement durant cette étude. Le tableau ne reprend que les souches dont l'entièreté du gène CYP51 a pu être visualisé (n = 24). Les informations et la nomenclature permettant de mettre au point le tableau sont décrites par Leroux et Walker (2011) et Huf *et al.* (2018) cependant d'autres génotypes sont susceptibles d'exister et ont déjà été mentionnés dans des travaux similaires.

Classe phénotypique principale		Phénotype*	N° Souche	Codon du gène CYP51 ¹								Type génotypique	Nombre d'altérations ²
				134	136	379	381	459	460	461	524		
	TriS	TriS	Mycgr3G110231	D	V	A	I	Y	G	Y	S	Wild-type	0
Classe phénotypique principale	TriL	TriR1	-									-	-
		TriR2	-									-	-
		TriR3	-									-	-
		TriR4	-									-	-
		TriR5	-									-	-
	TriMR	TriR6	-									-	-
		TriR7	-									-	-
		TriR8/G1	126/09	D	V	G	V	/	/	Y	S	Type B	3
			16T3A2	D	V	G	V	/	/	Y	S	Type B	3
		TriR9	16T1T14	D	A	A	I	/	/	Y	T	Type B	3
		TriR10/E5	16T1A10	D	A	A	V	Y	G	H	T	Type A	4
		TriR11/E4	16T1A2	G	A	A	V	Y	G	H	S	Type A	4
			16T2A19	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			16T3T19a	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			17T1A11 rep4	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			17T2A1 rep1	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			17T2A5 rep2	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			17T2T5 rep2	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			17T3A5 rep2	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			17T3T1 rep2	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			16TEA19	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			16T3T20	G	A	A	V	Y	G	H	S		
			17T2A3 rep4	G	A	A	V	Y	G	H	S		
		F8	16T1A6	G	A	A	V	Y	G	H	T	Type A	5
			16T1A15	G	A	A	V	Y	G	H	T		
			16T3A7	G	A	A	V	Y	G	H	T		
			17T1T6 rep1	G	A	A	V	Y	G	H	T		
			17T2T6 rep3	G	A	A	V	Y	G	H	T		
		TriR12	-									-	-
		TriRz	10/08	G	A	A	I	/	/	Y	S	Type B	3
		H6	17T2A17 rep4	D	C	G	V	/	/	Y	T	Type B	4
		?	17TEA4 rep3	G	A	G	V	/	/	Y	T	Type B	6

¹ Les codons mentionnés sont uniquement des codons pertinents pour l'étude de la résistance de *Z. tritici* face aux DMIs. En effet, les altérations telles que L50S, R177C, S188N et N513K font partie du génotype d'une souche mais n'ont pas d'effet clair par rapport au niveau de résistance d'une souche face aux DMIs.

² La double délétion ΔY459/G460 a été considérée comme une seule altération. L'altération V136C n'est pas reconnue comme ayant un effet clair sur le comportement de résistance/sensibilité de *Z. tritici* face aux DMIs donc ne change pas le nombre d'altérations dans cette liste.

*La nomenclature 'Tri' se base sur les recherches réalisées par Leroux et Walker (2011). La nomenclature en majuscule (ex. G1) a nouvellement été proposée par Huf *et al.* (2018) afin de suivre l'évolution continue du gène CYP51 jusqu'à présent et donc d'associer des phénotypes non décrits par Leroux et Walker (2011) à des nouveaux génotypes découverts depuis.

Au niveau des codons pertinents, ce sont les souches 126/09 (TriR8/G1), 16T3A2 (TriR8/G1), 16T1T14 (TriR9) et 10/08 (TriRz) qui portent le moins de mutations (cf. tableau 7). Il s'agit également de souches classées comme sensibles et montrant les valeurs d'EC₅₀ les plus faibles par rapport au prothioconazole (cf. tableau 6). En revanche, les génotypes des quatre souches ont été associés à des phénotypes décrivant un niveau de résistance moyen face aux DMIs. En ce qui concerne la souche 16T1T14, elle a été associée au phénotype TriR9. Selon Leroux et Walker (2011), ce phénotype est relié à un niveau de résistance faible face au tébuconazole et moyen face au prothioconazole. Malgré l'absence de la mutation I381V et la présence de la combinaison [V136A-S524T], les résultats montrent le contraire, notamment une sensibilité moindre face au tébuconazole et élevée face au prothioconazole. Enfin, le génotype de la souche 10/08 a été relié au phénotype TriRz, également associé à la classe phénotypique TriMR. La souche 17TEA4 rep3 porte le plus grand nombre de mutations au niveau des codons pertinents avec un total de six altérations sur sept (cf. tableau 7). Aucun phénotype n'a pu être associé à la souche car son génotype n'a pas été décrit dans la littérature jusqu'à présent. La souche a cependant été placée dans la catégorie TriMR en raison de sa valeur d'EC₅₀ élevée vis-à-vis du prothioconazole et moyenne vis-à-vis du tébuconazole (cf. tableau 6). Deux génotypes regroupent la majorité des souches étudiées. Ils sont tous les deux caractérisés par la présence de la combinaison [D134G-V136A-I381V-Y461H], avec une distinction entre les deux génotypes selon qu'il y ait la mutation S524T en plus ou pas. Le génotype sans la mutation S524T a été associé au profil phénotypique de résistance moyen TriR11/E4 caractérisé par une sensibilité moindre des souches face aux deux triazoles tandis que le génotype avec la mutation S524T a été relié au profil phénotypique de résistance moyen F8 caractérisé par des valeurs d'EC₅₀ plus élevées face au prothioconazole que dans le cas du premier génotype. Enfin, les deux dernières souches, 16T1A10 et 17T2A17 rep4, ont été associées aux phénotypes TriR10/E5 et H6 respectivement (cf. tableau 7).

Sur les 27 souches séquencées, 24 d'entre elles ont été analysées vis-à-vis de leur relation génotype-phénotype. Parmi celles-ci, 8 génotypes différents ont été décrits. Les populations belges de *Z. tritici* étudiées au cours de ce travail ont toutes démontré un niveau de résistance moyen face aux deux triazoles analysés. Au niveau des codons pertinents, toutes les souches ont porté minimum trois mutations différentes au sein de leur gène CYP51 tandis que le nombre maximum d'altérations observé a été de six sur sept. Le type génotypique « a » a le plus souvent été observé car la majorité des souches avaient la substitution Y461H au lieu de la double délétion ΔY459/G460 (cf. tableau 7). Le génotype le plus fréquemment retrouvé était celui associé au phénotype TriR11/E4. En effet, la combinaison [D134G-V136A-I381V-Y461H] a été identifiée parmi douze souches représentant ainsi 50% de la population étudiée.

Le phénotype F8, caractérisé par la combinaison [D134G-V136A-I381V-Y461H-S524T], a été retrouvé dans 21% des cas suivi ensuite du phénotype TriR8/G1 représentant, avec la combinaison [A379G-I381V-ΔY459/G460], 8.3% de la population étudiée. Enfin, les phénotypes TriR9 ([V136A-ΔY459/G460-S524T]), TriR10/E5 ([V136A-I381V-Y461H-S524T]), TriRz ([D134G-V136A-ΔY459/G460]) et H6 ([A379G-I381V-ΔY459/G460-S524T]) ont chacun été retrouvé à la plus faible fréquence, notamment 4.2%, ce qui a également été la fréquence de survenue du phénotype inconnu ([D134G-V136A-A379G-I381V-ΔY459/G460-S524T]) associé à la souche 17TEA4 rep3.

4.4 Analyse de la valeur sélective des souches de *Z. tritici* en serres

Plusieurs critères d'observation ont été mis en place afin d'observer le développement de la maladie dans le but de comparer les valeurs sélectives entre les 25 souches sélectionnées pour cette étude. En ce qui concerne la première catégorie de critères en lien avec la rapidité de développement de la maladie, la cotation binaire n'a pas permis d'apporter une réponse définitive sur ce point. En ce qui concerne la deuxième catégorie à savoir l'aspect quantitatif de la maladie, la sénescence naturelle des feuilles a limité la période d'observation préalablement planifiée, limitant très fort la portée des résultats de notre expérimentation. Nous avons cependant choisi de réaliser une analyse sur une seule observation temporelle pour réaliser une analyse cohérente des résultats, en tenant compte des observations sur feuilles non sénescentes. Vingt jours après l'inoculation, la surface de feuille atteinte (%) par les symptômes caractéristiques de la septoriose (nécroses) a été cotée sur une échelle de 1 à 6.

		Souches de <i>Z. tritici</i> classées par valeur EC ₅₀ croissante au prothioconazole																									Somme cumulée totale par variété		
Variété																													
		10	6	25	39	20	23	15	56	38	29	39	29	12	27	16	30	47	18	32	26	42	14	35	21	10	37	47	
Olympus (++)		1	3	6	7	7	6	8	20	8	6	9	8	7	7	3	6	10	8	6	15	13	4	12	6	4	15	13	218
Chevignon (+)		6	1	3	9	4	2	2	7	4	10	8	2	3	6	0	1	9	5	0	0	4	3	2	6	1	6	0	104
RGT Reform (=)		1	0	10	14	5	8	5	12	10	7	8	8	2	13	5	7	11	3	15	5	18	3	12	4	3	4	21	214
Henrik (-)		2	2	9	6	4	7	0	17	16	6	14	11	0	1	8	16	17	2	11	6	7	4	9	5	2	12	13	207
		09-BDEb OP_15_13 Témoin Tween																											
		12/09. 16/13A2 10/08. 16/11/14 16/13/19a 17/12/5 rep2 17/12A5 rep2 17/12A1 rep1 17/13A5 rep2 17/13T1 rep2 17/12/3 rep3 16/11A2 16/12A19 17/11/6 rep1 17/11A11 rep4 17/13A6 rep3 17/12/6 rep3 16/11A10 16/13A7 16/11A15 17/12A17 rep4 17/12E4 rep3 16/12E19																											
		Valeur EC ₅₀ croissante au prothioconazole																											
		++ : résistante + : peu sensible = : moyennement sensible - : assez sensible																											

Figure 21 : Sévérité de 25 souches de septoriose, classées en abscisse selon leur niveau de résistance au prothioconazole, sur quatre variétés de blé. Les classes de sévérité correspondent à un pourcentage de surface foliaire atteinte (%) par les symptômes caractéristiques de la septoriose. Cette surface de symptômes a été évaluée sur chaque feuille d'intérêt dans la zone délimitée de 5 cm et selon une échelle de cotation allant de 1 à 6 (1=0-5% ; 2=5-10% ; 3=10-20% ; 4=20-40% ; 5=40-60% ; 6=60-90%). La cotation des neuf feuilles inoculées avec la même souche a été cumulée par variété. Encadré en bleu : les séries de feuilles non inoculées (Témoin et Tween) et inoculées par une souche de France résistante aux DMIs (09-BDEb) et une souche d'Irlande sensible aux DMIs (OP_15_13).

A travers ces résultats, plusieurs choses sont constatées. Tout d'abord, certains symptômes légers sont constatés sur les feuilles non inoculées (cf. figure 21). Ces symptômes peuvent être

liés à la manipulation. Comme ils sont nettement plus faibles que dans le cas d'inoculation des souches, ils ne devraient pas interférer avec notre analyse. Ensuite, au niveau des quatre variétés de blé, des souches sensibles ainsi que des souches résistantes ont été capables de déclencher la maladie sans qu'il y ait une distinction claire entre les deux catégories de souches. En effet, la somme cumulée totale de symptômes provoqués sur les quatre variétés par souche montre que c'est la souche sensible 16T1T14 qui a développé des symptômes ayant couvert le plus de surface foliaire au total tandis que c'est la souche 17T3A5 rep3, également sensible, qui a développé des symptômes ayant couvert le moins de surface foliaire totale. La souche la plus résistante au prothioconazole, notamment 16TEA19, est la deuxième souche à avoir développé la plus grande quantité de symptômes caractéristiques (cf. figure 21). Au vu de nos résultats, les symptômes de la septoriose semblent s'être développés de manière équivalente entre les souches des deux catégories. Cela suggère que le niveau de résistance d'une souche n'impacte pas directement sa capacité d'infection et sa rapidité à développer des symptômes caractéristiques de la maladie. Un lien peut être établi avec sa capacité d'infection et de survie sur plante en champ.

Cependant, nous constatons que la maladie n'a pas exercé la même pression selon la variété utilisée. En effet, la variété Chevignon se démarque des autres par sa résistance plus accentuée face à la maladie. La somme cumulée totale de l'ensemble des symptômes produits par toutes les souches par variété indique une valeur deux fois inférieure pour Chevignon comparativement à celles pour les autres variétés de blé. C'est également la seule variété qui n'a pas montré de symptômes suite à l'inoculation de celle-ci avec la souche la plus résistante au prothioconazole 16TEA19 (cf. figure 21). La variété Olympus (++) quant à elle, a été associée à la plus grande somme cumulée totale de l'ensemble des souches. Ce résultat est surprenant dans la mesure où son niveau de résistance à la septoriose en champ (++) serait supérieur à celui des trois autres variétés.

5. DISCUSSION

Le premier objectif de ce travail était d'étudier l'évolution de la résistance de populations belges de *Z. tritici* aux DMI, en particulier au prothioconazole et au tébuconazole, et de la comparer à celle d'autres pays européens. Le second objectif était d'étudier la performance des traitements fongicides en champ et l'impact de ceux-ci sur l'évolution de la résistance du champignon à ces matières actives afin d'évaluer si les traitements fongicides ont un impact sur l'évolution de la résistance et s'il est possible de la contrer et de proposer un plan de traitement fongicide anti-résistance en conséquence. Enfin, le troisième objectif était de comparer les valeurs sélectives de souches résistantes et sensibles sur différentes variétés de blé dans le but d'évaluer si l'augmentation du niveau de résistance d'une souche s'associait ou non à une pénalité au niveau de sa capacité d'infection et de sa survie en champ.

5.1 Evolution de la résistance de *Z. tritici* au prothioconazole et au tébuconazole en Belgique

Afin de mettre à jour la situation actuelle de la résistance de *Z. tritici* en Belgique, plusieurs étapes de ce travail ont été mises en parallèle.

En premier lieu, les tests de sensibilité *in vitro* réalisés sur les quatre populations de souches en 2008 (nombre de souches testées (n)=39), 2009 (n=24), 2016 (n=29) et 2017 (n=32), ont montré des résultats divergents selon la matière active analysée (cf. figure 16). Au niveau du prothioconazole, les souches anciennes (2008-2009) montrent une sensibilité plus élevée que les souches contemporaines (2016-2017) : en moins de dix ans la valeur médiane des EC₅₀ de la population est passée de 0.02 mg/l à environ 0.2 mg/l, soit dix fois supérieure. Une grande évolution de la résistance des souches à cette matière active a été constatée entre 2008 et 2017. Ceci est en concordance avec des recherches similaires effectuées par Blake *et al.* (2017) au Royaume-Uni et par Heick *et al.* (2017) à travers divers pays nordiques et baltes. Néanmoins, l'écart entre la valeur d'EC₅₀ minimale (= 0.02 mg/l) et maximale (= 5.05 mg/l) suggère qu'une évolution du niveau moyen de résistance de la population au prothioconazole vers un niveau supérieur est encore possible.

En revanche, dans le cas du tébuconazole, aucune différence significative de la sensibilité n'est constatée entre les quatre populations de souches (valeur médiane des EC₅₀ autour de 0.64 mg/l). Il semble que le niveau de résistance au sein des populations belges de *Z. tritici* ait atteint une valeur limite face au tébuconazole depuis 2008 et que malgré un changement du facteur de variabilité 'année d'isolement', ce niveau de résistance stagne au sein de ces populations. Notre étude nous permet uniquement d'observer ce phénomène depuis 2008 mais selon des études belges traitant le même sujet, une érosion importante de la sensibilité

dans les populations belges aurait encore été observée entre 2007 (n=47) et 2008 (n=376) (Clinckemaillie et Legrève, communication personnelle). En effet, la valeur médiane des EC₅₀ est passée d'environ 0.32 mg/l à 0.64 mg/l sur ce laps de temps. Depuis lors, nous constatons que le niveau de résistance des populations belges au tébuconazole n'a plus augmenté de manière significative. Au Royaume-Uni, ce shift important de l'érosion de la sensibilité au tébuconazole a été enregistré entre 2003 et 2004, c'est-à-dire au même moment où la fréquence de survenue de la mutation G143A, impliquée dans la résistance aux strobilurines, a énormément augmenté dans les isolats testés passant de 40% à 80% (Fraaije *et al.*, 2007). Comme suggéré par Fraaije *et al.* (2007), ceci pourrait être lié à un effet auto-stop de la sélection de la résistance aux strobilurines qui aurait de ce fait induit la sélection de la mutation I381V, impliquée dans la résistance au tébuconazole, en même temps que la mutation G143A. Ainsi, un lien peut être fait avec les résultats obtenus en Belgique où la fréquence de survenue de la mutation G143A est passée d'environ 50% à 85% entre 2005 et 2007 (Legrève, communication personnelle). En analysant nos résultats, cette hypothèse pourrait effectivement être à l'origine de ce shift important de l'érosion de la sensibilité au tébuconazole en Belgique entre 2007-2008 et de ce fait expliquer pourquoi il n'y pas eu de deuxième shift important dans les populations belges. Nos résultats sur l'effet des traitements fongicides en champ en 2016 et en 2017 ne permettent pas d'évaluer si une pression seule de DMI accentuerait encore l'érosion de la sensibilité au tébuconazole.

On pourrait en conclure que le niveau de résistance, dans ce cas à deux DMIs, évolue et pourrait conduire à une perte d'efficacité des DMIs en champ. Cependant, contrairement à d'autres fongicides comme les strobilurines où une résistance quasi totale est apparue au sein des populations à travers l'Europe (Lucas *et al.*, 2015), nos résultats pour les deux matières actives testées associés à ceux observés dans d'autres pays européens pour d'autres matières actives également ne suggèrent pas l'évolution vers une résistance totale puisqu'un certain nombre de souches sensibles reste prévalent dans les populations (Strobel *et al.*, 2017). Le décalage du moment d'apparition d'un certain niveau de résistance dans les populations de *Z. tritici* à travers les pays européens pourrait quant à lui être lié aux différences des conditions climatiques entre pays qui induisent ou pas une pression plus accentuée de la maladie et de ce fait une sélection plus forte de nouveaux génotypes au sein des populations de *Z. tritici*, comme décrit dans la littérature (Shaw *et al.*, 2008 ; Torriani *et al.*, 2015 ; Heick *et al.*, 2017).

Sur le plan de la diversité génétique du gène CYP51 au sein de la population belge, nous avons pu mettre en évidence 11 mutations à travers les 27 souches séquencées, qu'elles soient sensibles ou résistantes au tébuconazole et au prothioconazole. Cette diversité peut être liée

à l'évolution de la résistance aux DMIs. Dans nos résultats, les profils génotypiques sont fortement différents selon le niveau de sensibilité des souches mais aussi selon l'année de récolte. Pour les deux souches récoltées en 2008-2009, deux génotypes extrêmement différents ont été observés contrairement à ce qui est observé pour les souches récoltées en 2016-2017 où les profils génotypiques étaient très proches les uns des autres hormis quelques exceptions (cf. tableau 6). Il semble donc que l'on assiste à une évolution vers un profil stable du gène CYP51 dans le temps. Une analyse approfondie de la relation entre les différentes mutations observées à travers nos souches et les valeurs des EC₅₀ de ces souches et d'autres travaux relatifs au même sujet (Fraaije *et al.*, 2007 ; Leroux *et al.*, 2007 ; Stammler *et al.*, 2008 ; Cools *et al.*, 2011 ; Leroux et Walker, 2011 ; Stammler et Semar, 2011 ; Cools *et al.*, 2013 ; Huf *et al.*, 2018), nous amène à relever plusieurs relations intéressantes. Les substitutions D134G, V136A et I381V sont détectées dans 50% de nos souches de 2008-2009. Pas moins de dix ans plus tard, ces mêmes mutations sont identifiées dans 80%, 88% et 95.5% de nos souches de 2016-2017 (cf. tableau 6). Elles sont également de plus en plus retrouvées en combinaison contrairement aux anciennes souches où la combinaison [D134G – V136A – I381V] n'a même pas été identifiée. Ces observations concordent avec les analyses effectuées par Cools *et al.* (2013) et Leroux et Walker (2011) où ces mutations sembleraient, d'une part, être associées à une réduction de la sensibilité des isolats aux triazoles concernés et, d'autre part, être plus récurrentes avec le temps. Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature (Leroux et Walker, 2011 ; Cools *et al.*, 2013 ; Heick *et al.*, 2017), nos résultats montrent que la combinaison des deux mutations D134G et V136A ne semble pas avoir un effet si prononcé sur la résistance au prothioconazole car des souches venant des deux catégories (sensibles et résistantes) sont en possession de cette combinaison. En revanche, l'importance de la mutation S524T, comme suggéré par Leroux et Walker (2011), dans la réduction de sensibilité d'une souche à plusieurs DMIs, en particulier au prothioconazole, est mise en évidence durant ce travail. En effet, la mutation S524T est survenue dans 72.7% des cas au niveau des souches résistantes et dans 7.69% des cas au niveau des souches sensibles (cf. tableau 6). Ainsi, elle a été de loin la mutation la plus importante pour pouvoir distinguer une souche sensible d'une résistante par rapport aux deux triazoles. Vu les résultats, elle ne semblerait pas encore s'être installée définitivement dans toutes les populations belges de *Z. tritici* comme ce serait le cas avec les autres substitutions discutées ci-dessus. L'introduction plus tardive du prothioconazole (depuis 2005) par rapport aux autres triazoles (ex. tébuconazole 1989) pourrait expliquer ceci. Etonnamment, la substitution S524T est aussi présente dans la souche 16T1T14 alors que cette dernière est classifiée sensible. Plusieurs raisons pourraient être à l'origine de ce phénomène. Premièrement, il se pourrait que l'utilisation excessive du

prothioconazole depuis quelques années ait stimulé le champignon à généraliser la présence de la mutation au sein du gène CYP51 aussi bien chez les souches résistantes que chez les souches sensibles. Deuxièmement, il est possible que l'absence d'autres mutations telles que D134G et I381V ait limité le niveau de résistance qui, malgré la présence de la mutation S524T, reste dans la catégorie de souches sensibles. Cela montrerait l'importance des combinaisons de mutations dans l'évolution de la résistance d'une souche face à ces deux DMIs.

L'analyse de la relation génotype-phénotype a mis en évidence 8 génotypes différents parmi les 24 souches sur les 27 séquencées. Toutes les souches ont été caractérisées par un niveau de résistance moyen face aux deux triazoles analysés (cf. tableau 7). Parmi nos 24 souches, le phénotype TriR11/E4 ([D134G-V136A-I381V-Y461H]) a le plus souvent été identifié ce qui est également le cas en 2018 dans d'autres pays européens tels que la France, l'Allemagne, l'Angleterre et les Pays-Bas (Huf *et al.*, 2018). Cependant, en 2008, c'était le phénotype TriR8 ([A379G-I381V-ΔY459/G460]) qui dominait dans ces mêmes pays ainsi qu'en Belgique (Stammler *et al.*, 2008). Ainsi, ceci indiquerait que la mutation I381V, déjà présente dans la majorité des souches en 2008, persiste dix ans plus tard et joue encore toujours un rôle dans la résistance des souches au tébuconazole. Cela pourrait expliquer pourquoi nous n'avons observé aucune différence à ce niveau entre 2008 et 2017. En revanche, la combinaison D134G-V136A s'est montrée plus récurrente avec le temps et se retrouve désormais dans la majorité des souches de 2016-2017 ce qui n'était pas le cas dans nos souches de 2008-2009 ainsi que dans les recherches effectuées par Stammler *et al.* (2008). Ceci pourrait en partie expliquer la plus grande résistance au prothioconazole même s'il s'agit de souches classifiées sensibles. Enfin, dans 21% des cas, nous avons observé que, lorsque la mutation S524T est en combinaison avec les mêmes mutations retrouvées dans le phénotype TriR11/E4, la résistance au prothioconazole est accentuée. Cela montre que le phénotype F8 et donc la mutation S524T jouent un rôle prépondérant dans l'évolution de la résistance mise en évidence dans nos résultats d'EC₅₀. N'étant cependant pas présente dans la majorité des souches séquencées, cela appuie l'hypothèse comme quoi une évolution vers un niveau supérieur en résistance face au prothioconazole est encore possible.

Les résultats du séquençage du gène CYP51 indiquent que les mutations jouant le plus grand rôle (D134G, V136A, I381V, S524T) dans la sensibilité des souches face aux deux DMIs sont récurrentes au sein des populations de souches étudiées en Belgique, certaines depuis plus longtemps que d'autres. Ceci pourrait expliquer les tendances évolutives de la résistance des populations belges de *Z. tritici* face au tébuconazole et au prothioconazole.

Dix des 11 mutations révélées dans notre travail étaient déjà rapportées dans la littérature, notamment par Cools *et al.* en 2013, tandis que la mutation R177C, observée dans la populations belge étudiée, n'a pas encore été décrite dans la littérature. Il s'agit de la substitution d'une arginine (R) par un résidu cystéine en position 177 (R177C) de la protéine. Cette mutation a été identifiée dans une souche isolée en 2017 (17T2A1 rep1) et ne semble pas être associée à un niveau de résistance significatif face aux DMI. En effet, la souche concernée a été classifiée sensible car elle indiquait des valeurs d'EC₅₀ égales à 0.396 et 0.946 µg/ml par rapport au prothioconazole et au tébuconazole respectivement (cf. tableau 6). Il est cependant impossible d'avoir une idée claire de l'effet de la mutation R177C vis-à-vis des triazoles et de sa prévalence car elle n'a été révélée qu'une seule fois durant l'étude. Cette découverte constitue néanmoins une preuve que le champignon est en continuelle évolution.

Notre travail ayant été réalisé sur 27 souches et ayant porté sur des souches non sélectionnées aléatoirement mais bien sur base de leurs valeurs EC₅₀, il serait utile de faire une analyse sur l'entière des souches caractérisées *in vitro* durant ce travail afin d'avoir une vision plus complète de la diversité génétique actuelle en Belgique. Il est à noter aussi que dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur le gène CYP51. D'autres gènes liés à d'autres mécanismes d'action étant impliqués dans la résistance des souches de *Z. tritici* aux DMI et à d'autres familles de fongicides (multi drug resistance) (Fraaije *et al.*, 2007 ; Leroux et Walker, 2011), il est possible que la caractérisation de ces gènes permette aussi d'expliquer les différents niveaux de résistance observés dans cette étude.

5.2 Performances des traitements fongicides en champ et impact de ceux-ci sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici* aux DMI

L'analyse de la sévérité de la maladie observée dans les champ étudiés (Ath et Thy-le-Château) entre 2016-2017 a été un élément essentiel pour mettre en place des explications concernant les performances des différents traitements fongicides en champ sur la maladie et sur les rendements durant les deux saisons culturales ainsi que leur impact sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici* aux triazoles en Belgique.

Cette analyse a montré, sur les deux années, que l'application d'un traitement quelconque a permis d'obtenir des rendements plus importants qu'en l'absence de traitement. Il n'est cependant pas possible au vu de nos résultats sur deux années et sur deux champs de mettre en évidence un traitement qui aurait été économiquement plus efficace qu'un autre. Plusieurs éléments peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, la pression de la septoriose a varié fortement d'une année à l'autre et d'un champ à l'autre. Une telle différence de pression est sans doute principalement due aux variations des conditions météorologiques. Ainsi, des

conditions plus favorables au développement du champignon en 2016 pourraient être à l'origine de cette pression plus forte par rapport à 2017. Cette hypothèse est appuyée par le fait que la même variété de blé, Henrik, a été utilisée à Ath en 2016 et en 2017 et donc que le facteur variétal n'est pas impliqué. La pression variable de la septoriose selon la localité et selon le champ est par ailleurs un phénomène couramment observé (Duvivier *et al.*, 2013). Deuxièmement, les traitements fongicides appliqués ne ciblent pas uniquement la septoriose. Ils ont donc tous pu influencer les autres maladies fongiques présentes dans les deux localités et sur les deux années. Cette hypothèse est appuyée par le fait que même en l'absence de septoriose en 2017 tous les traitements fongicides à Thy-le-Château se sont révélés favorables au rendement.

Quand on analyse l'impact des différents traitements fongicides appliqués durant les saisons culturales 2015-2016 et 2016-2017 sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici*, nos résultats montrent une divergence de cet impact selon la matière active analysée. Dans le cas du prothioconazole, une différence significative de la sensibilité des souches récoltées entre 2016 et 2017 selon le type de traitement appliqué durant la saison culturale a été constatée (cf. figure 18). Ainsi, le traitement T1 (Adexar (GS39) : époxiconazole (DMI) + fluxapyroxad (SDHI)) se montre être le traitement qui réduit le plus le niveau de sensibilité des populations de souches. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les souches du champignon isolées après ce traitement ont été exposées à des matières actives dont les mécanismes d'action étaient différents de celui du prothioconazole, surtout au niveau du SDHI. Ainsi, ces souches ont pu développer des mécanismes de résistance au SDHI qui ne leur ont pas été utiles lorsqu'elles se sont finalement retrouvées face au prothioconazole. En revanche, le traitement T3 (Kestrel ou Input (GS32) : prothioconazole + tébuconazole ou prothioconazole + spiroxamine ; Bravo (GS32) : chlorothalonil ; Adexar (GS55) : époxiconazole et fluxapyroxad), se montre être le traitement qui réduit le moins le niveau de sensibilité des populations de souches. En analysant son contenu, il est probable qu'une première sélection de la résistance au prothioconazole ait pris place durant la saison culturale vu l'apport du fongicide Kestrel au stade 32. Cela aurait pu atténuer l'effet de l'Adexar qui ne parvient pas à contrôler la maladie de la même façon que dans le traitement T1. Cet effet d'atténuation de l'Adexar pourrait également être expliqué par l'application plus tardive du produit ne laissant pas le temps aux matières actives de produire leur plein effet sur le champignon. Une autre explication est l'effet de la dose mais la différence au niveau de celui-ci ne s'est pas montrée être significative entre traitement T2 et T3 et mériterait une analyse plus approfondie. Dans le cas du tébuconazole, une différence significative de la sensibilité a été constatée mais l'analyse ne nous permet pas de dire lequel de ces quatre traitements a eu l'effet le plus prononcé sur la

sélection de souches plus résistantes ou plus sensibles. L'observation visuelle laisserait cependant croire que c'est le traitement T3 qui aurait sélectionné les souches les plus sensibles au tébuconazole en moyenne sur les deux années mais cela n'est pas supporté statistiquement (cf. figure 19).

De manière générale, l'application d'un traitement fongicide est essentiel si l'on veut atteindre un rendement optimal. En effet, nous avons observé que les rendements les plus faibles ont toujours été obtenus lorsqu'un aucun traitement n'était appliqué durant la saison culturale. Nos résultats ont montré que dans l'utilisation du prothioconazole et du tébuconazole le traitement T1 pourrait être la meilleure solution pour lutter contre la maladie de façon durable. Ce traitement a cependant des avantages et des inconvénients. En effet, au niveau du rendement tout d'abord, le traitement T1 n'a peut-être pas permis d'obtenir les meilleurs rendements, mais ceux-ci sont cependant quasiment identiques aux meilleurs rendements sur les deux années à Thy-le-Château (± 100 kg/ha) voire un peu plus faibles sur les deux années à Ath (± 500 kg/ha). En compensation, l'agriculteur ne doit pulvériser qu'une fois au lieu de deux. Sachant qu'un passage au pulvérisateur coûte environ 6-15 euros/ha et que la quantité du nombre d'intrants, dont les prix varient fortement, diminue par rapport aux autres traitements, cela permettrait de facilement combler le faible manque de rendement voire même largement augmenter le bénéfice de l'agriculteur. Ensuite, au niveau du contenu du traitement T1, bien que le mélange d'époxiconazole et de SDHI se soit montré efficace dans cette étude ainsi que dans des travaux relatifs au même sujet (Wieczorek *et al.*, 2015 ; Heick *et al.*, 2017), il est très fort probable que ce même mélange puisse être à l'origine d'une augmentation du nombre de souches résistantes d'une part, à l'époxiconazole ou, d'autre part, au fluxapyroxad (SDHI) voire même aux deux matières actives. Cependant, les recherches de Fraaije *et al.* (2012) ont suggéré que l'association DMI/SDHI serait capable de diminuer la résistance aux DMIs sans changer le niveau de résistance face aux SDHI. Ceci a plus récemment été mis en évidence par Wieczorek *et al.* (2015) et par Dooley *et al.* (2016) mais il semblerait que la dose aurait un rôle primordial à jouer comme décrit dans ces recherches. Ainsi, il serait intéressant d'analyser l'effet de l'Adexar à plusieurs doses sur le niveau de sensibilité des souches face à ces deux matières actives afin de vérifier ce phénomène en Belgique. Au niveau de son application, son unique application au stade dernière feuille étalée pourrait être problématique durant les années où la pression de la maladie est forte pendant la montaison. Dans ce cas, il est vivement conseillé de traiter la maladie avant la dernière feuille et de traiter une nouvelle fois après le stade dernière feuille complètement déployée pour assurer une protection des derniers étages foliaires formés, responsable du remplissage du grain. Cette application unique pourrait également être insuffisante pour lutter contre d'autres maladies

ravageuses des cultures de blé comme les rouilles jaune et brune et la fusariose, bien que ceci n'ait pu être observé lors des deux années étudiées.

En plus du choix de traitement, il est important de se pencher sur d'autres facteurs qui pourraient entrer en jeu au niveau du développement, de l'impact et de l'évolution de l'agent pathogène et qui de ce fait ont un impact sur le schéma de traitement. Par exemple, l'analyse des essais a montré que la pression de la maladie peut être très localisée. Cela peut être dû à des variations des conditions climatiques, des sols différents, des microenvironnements, etc. Une lutte plus locale pourrait être une solution efficace dans la lutte contre la septoriose et autres maladies fongiques comme c'est déjà le cas en France où la lutte régionale s'avère être efficace depuis quelques années (Note Commune INRA-ARVALIS-ANSES, 2018). Au vu de la taille de la Wallonie, la pertinence d'un découpage local est d'ailleurs pris en compte dans les avertissements réalisés par le Centre pilote wallon des céréales et oléo-protéagineux (CEPICOP).

5.3 Comparaison des valeurs sélectives de souches résistantes et sensibles sur différentes variétés de blé

L'analyse de la valeur sélective de chaque souche de *Z. tritici* testée dans cette étude sur quatre variétés de blé montre deux choses. Premièrement, le niveau de résistance n'a pas eu d'impact sur la maladie quelle que soit la variété utilisée. Ainsi, il semblerait au vu de nos résultats que la mise en place d'un mécanisme de résistance tel qu'une mutation supplémentaire dans le gène CYP51 permet d'augmenter le niveau de résistance de la souche *in vitro* mais n'a pas d'impact sur sa capacité d'infection et de survie en champ. Deuxièmement, la pression de la maladie semble avoir été contrôlée de manière différente selon la variété de blé choisie. Le fait que la variété Chevalon (+) ait été moins impactée par la maladie que les variétés Henrik (-) et RGT Reform (=) nous conforte dans l'idée que la sélection de variétés plus résistantes joue un rôle non négligeable dans le contrôle de la maladie.

Notons que cette étude n'a pas délivré les résultats attendus en raison d'une sénescence naturelle des feuilles apparue dans les conditions de l'expérimentation avant même que la septoriose n'ait pu s'extérioriser pleinement. Si l'expérimentation devait être reproduite, certains aspects nécessiteraient plus d'attention. Ainsi, il s'agirait de trouver un système de cotation permettant une observation plus précise qu'à l'œil nu et plus standardisée ou d'inoculer des plantes plus âgées et dans des conditions expérimentales moins asséchantes. Choisir des variétés assurant une survie expérimentale permettant d'aller au bout de la recherche est également à considérer.

6. CONCLUSION

L'objectif principal de ce mémoire de fin d'études était d'étudier le comportement de populations belges de *Z. tritici* isolées à des dates différentes (2008, 2009, 2016 et 2017) et récoltées à travers plusieurs champs dans le but de mesurer l'évolution de la résistance de champignon face à deux DMIs couramment employés en Europe : le prothioconazole et le tébuconazole. Dans la foulée, l'impact de divers traitements fongicides appliqués au champ sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici* face aux deux DMIs a été analysé dans le but de proposer un plan de traitement permettant de contrer au mieux cette évolution tout en répondant aux attentes économiques de l'agriculteur. Enfin, il nous est apparu intéressant d'étudier les valeurs sélectives d'une série de souches résistantes et sensibles sur quatre variétés de blé afin d'évaluer si la capacité d'infection et de survie d'une souche sont impactées par son niveau de résistance.

Les tests de sensibilité *in vitro* réalisés sur 306 souches belges ont mis en évidence des informations nouvelles. Pour le prothioconazole, une évolution significative de la résistance a été observée entre 2008 et 2017. Cette évolution n'a pas été détectée dans le cas du tébuconazole où une valeur limite du niveau de résistance des populations de souches belges serait vraisemblablement atteinte face à cette matière active. La caractérisation moléculaire d'une série de souches sélectionnées sur base de leurs valeurs EC_{50} a permis de mettre en évidence l'évolution de la diversité génétique du gène CYP51 en Belgique. Celui-ci jouerait un rôle dans l'évolution de la résistance observée suite aux tests de sensibilité *in vitro*.

L'analyse de la performance des traitements fongicides au champ a montré qu'un traitement fongicide permettait systématiquement d'obtenir des rendements plus importants qu'en l'absence de traitement. Au niveau de la réduction du niveau de sensibilité des souches de *Z. tritici* face au prothioconazole, le traitement T1 (époxiconazole (DMI) et fluxapyroxad (SDHI)) s'est montré le plus efficace pour lutter contre la maladie de façon durable. En effet, l'association de deux fongicides de familles différentes ainsi que le moment d'application du produit semblent avoir été déterminants pour l'efficacité du traitement. En ce qui concerne le niveau de résistance des souches de *Z. tritici* au tébuconazole, aucun traitement n'a conduit à des niveaux différenciés par rapport aux autres.

Les résultats obtenus lors de l'étude des valeurs sélectives des souches indiquent que quel que soit le niveau de résistance d'une souche, la valeur sélective ne semble pas être impactée peu importe la variété utilisée. Par contre, la résistance variétale joue un rôle primordial pour contrer la maladie peu importe le niveau de résistance du champignon. Parmi les quatre

variétés de blé, la variété Chevignon (+ : peu sensible) s'est montrée être la plus apte à contrer la maladie.

A l'issue de ce travail, nous avons pu mettre à jour la situation actuelle de la résistance de *Z. tritici* face au tébuconazole et au prothioconazole en Belgique. Il en ressort qu'il existe un lien possible entre cette résistance et la diversité génétique des souches, que le choix de certaines matières actives, appliquées sur les champs en Belgique chaque année, est important pour contrôler la maladie et que finalement la valeur sélective du champignon ne semble pas être impactée par le niveau de résistance de celui-ci comme souvent suggéré.

Face à ces résultats, il semblerait être intéressant de poursuivre l'étude sur un plus grand nombre de souches afin d'approfondir l'étude de la diversité de *Z. tritici* en Belgique. Deuxièmement, une analyse dans le temps permettrait de tester la durabilité des résultats. Ensuite, il serait intéressant de reproduire cette étude sur d'autres DMIs largement utilisés en Europe et en Belgique et de la comparer à des travaux relatifs au même sujet mais concernant également d'autres familles de fongicides telles que les SDHI.

La démarche que nous avons adoptée s'avère profitable pour mieux cerner le comportement de *Z. tritici* en Belgique. Bien entendu des questions demeurent et poursuivre l'évaluation de l'effet des matières actives sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici* face aux DMIs et aux SDHI permettrait de mieux comprendre comment le champignon se comporte et comment celui-ci pourrait être combattu à l'avenir. Un mémoire connexe réalisé par Alice Nysten sur l'évolution de la résistance de *Z. tritici* aux SDHI 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 les évolutions des résistances face à ces deux familles chimiques. Ces analyses permettront d'améliorer encore les stratégies adaptées pour contrôler la maladie le plus durablement possible tout en optimisant le rendement financier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amand, O., Calay, F., Coquillart, L., Legat, T., Bodson, B., Moreau, J. M., Maraite, H. (2003) - First detection of resistance to QoI fungicides in *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in Belgium - Communications in agricultural and applied biological sciences, vol. 68, no 4 Pt B, pp. 519-531.
- Ansar, M., Cheema, N. M., Leitch, M. H. (2010) - Effect of agronomic practices on the development of septoria leaf blotch and ITS subsequent effect on growth and yield components of wheat - Pakistan Journal of Botany, vol. 43, no 3, pp. 2125-2138.
- Arvalis (Novembre 2015) – Résistance de la Séptoriose : La résistance s'aggrave - <https://www.arvalis-infos.fr/resistance-de-la-septoriose-la-situation-s-aggrave-@/view-20383-arvarticle.html>
- Arvalis (Avril 2017) - Quel risque de septoriose sur blé en 2017 - <https://www.arvalis-infos.fr/voici-comment-estimer-le-risque-septoriose-sur-ble-en-2017-avec-la-methode-d-identification-des-symptomes-et-les-seuils-de-traitements--@/view-24267-arvarticle.html>
- Bataille, C., Duvivier, M., Heens, B., Mahieu, O., Meza Morales, W., Monfort, B. (2017) - 6. Lutte intégrée contre les maladies - Livre Blanc Céréales, pp. 80.
- Bataille, C., Duvivier, M., Heens, B., Mahieu, O., Meza Morales, W., Monfort, B. (2018) - 5. Lutte intégrée contre les maladies - Livre Blanc Céréales, pp. 86.
- Becher, R., Wirsal, S. G. (2012) – Fungal Cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens -Applied microbiology and biotechnology, vol. 95, no 4, pp. 825-840.
- Blake, J., Gosling, P., Fraaije, B. (2017) - Changes in field dose-response curves for DMI and QoI fungicides against *Zymoseptoria tritici* - Pest Management Science in Press, vol. 4725.
- Brokenshire, T. (1975) - Wheat debris as an inoculum source for seedling infection by *Septoria tritici* - Plant Pathology, vol. 24, no 4, pp. 202-207.
- Brown, J. S., Kellock, A. W., Paddick, R. G. (1978) - Distribution and dissemination of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter in relation to the epidemiology of speckled leaf blotch of wheat - Australian Journal of Agricultural Research, vol. 29, no 6, pp. 1139-1145.
- Clark, W. S. (2006) - *Septoria tritici* and azole performance - Aspects of Applied Biology, vol. 78, pp. 127-132.
- Cools, H. J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J. A., Fraaije, B. A. (2012) - Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype - Pest management science, vol. 68, no 7, pp. 1034-1040.
- Cools, H. J., Fraaije, B. A. (2013) - Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control - Pest management science, vol. 69, no 2, pp. 150-155.
- Cools, H. J., Hawkins, N. J., Fraaije, B. A. (2013) - Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi - Plant Pathology, vol. 62, no S1, pp. 36-42.
- Cools, H. J., Mullins, J. G., Fraaije, B. A., Parker, J. E., Kelly, D. E., Lucas, J. A., Kelly, S. L. (2011) - Impact of recently emerged sterol 14 α -demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity - Applied and environmental microbiology, vol. 77, pp. 3830-3837.

Cordo, C. A., Simon, M. R., Perelló, A. E., Alippi, H. E. (1999) - Spore dispersal of leaf blotch pathogens of wheat (*Mycosphaerella graminicola* and *Septoria tritici*) - *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals*, pp. 98-101.

de Vallavieille-Pope, C., Belhaj Fraj, M., Mille, B., Meynard, J. M. (2006) - Les associations de variétés : accroître la biodiversité pour mieux maîtriser les maladies - Les Dossiers de l'environnement de l'INRA, vol. 30, pp. 101-109.

Directive 2009/128/CE du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 instaurant un cadre d'action communautaire pour parvenir à une utilisation des pesticides compatible avec le développement durable, OJ L 309, 24.11.2009, p. 71–86.

Dooley, H., Shaw, M. W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J., Kildea, S. (2016) - Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI-insensitive field isolates carrying the SdhC-H152R and SdhD-R47W substitutions - *Pest management science*, vol. 72, no 12, pp. 2203-2207.

Dooley, H., Shaw, M. W., Spink, J., Kildea, S. (2016) - The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zymoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity - *Pest management science*, vol. 72, no 6, pp. 1150-1159.

Drabešová, J., Ryšánek, P., Brunner, P., McDonald, B. A., Croll, D. (2013) - Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and Quinone Outside Inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic - *European journal of plant pathology*, vol. 135, no 1, pp. 211-224.

Dumont, T., Lardinois, K., Maraite, H. (2006) - Maturation of *Mycosphaerella graminicola* pseudothecia on wheat plants inoculated for heritability analysis of QoI resistance - *Aspects of Applied Biology*, no 78, p. 133.

Duncan, K. E., Howard, R. J. (2000) - Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* - *Mycological research*, vol. 104, no 9, pp. 1074-1082.

Duvivier, M., Dedeurwaerder, G., De Proft, M., Moreau, J. M., Legrève, A. (2013) - Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium - *European Journal of Plant Pathology*, vol. 137, no 2, pp. 325-341.

Duvivier, M., De Proft, M., Bodson, B., Suffert, F., Planchon, V. (2015) - 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 - *Doctoral dissertation, UCL-Université Catholique de Louvain*.

Duvivier, M., Heens, B., Mahieu, O., Meza, R., Monfort, B., Legrève, A., ... Deproft, M. (2013) – 6. Lutte intégrée contre les maladies - *Livre Blanc Céréales*, pp. 57.

Eriksen, L., Munk, L. (2003) - The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its anamorph *Septoria tritici* in winter wheat during the growing season - *European Journal of Plant Pathology*, vol. 109, no 3, pp. 253-259.

Eyal, Z. (1999) - The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat - *European Journal of Plant Pathology*, vol. 105, no 7, pp. 629-641.

Eyal, Z., Scharen, A. L., Prescott, J. M., van Ginkel, M. (1987) - The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management - *CIMMYT, Mexico* - pp. 52.

FAO (Avril 2018) – FAO: Cereal Supply and Demand Brief | World Food Situation | Food and Agriculture Organization of the United Nations - <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>

Fones, H., Gurr, S. (2015) - The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective - *Fungal Genetics and Biology*, vol. 79, pp. 3-7.

Foulkes, M. J., Paveley, N. D., Worland, A., Welham, S. J., Thomas, J., Snape, J. W. (2006) - Major genetic changes in wheat with potential to affect disease tolerance - *Phytopathology*, vol. 96, no 7, pp. 680-688.

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*, vol. 13, no 3, pp. 263-275.

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 Qol-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola* - *Phytopathology*, vol. 95, no 8, pp. 933-941.

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*, vol. 8, no 3, pp. 245-254.

Fraaije, B. A., Lovell, D. J., Baldwin, S. (2002) - *Septoria* epidemics on wheat: Combined use of visual assessment and PCR-based diagnostics to identify mechanisms of disease escape - *PLANT PROTECTION SCIENCE-PRAGUE*, vol. 38, pp. 421-424.

Gagliardi, E., Carrera, A., Tréguier, A., Malaval, C., Deschamps, T., Bodilis, A. M. (2017) - Fongicides sur blé tendre : les stratégies région par région - *Perspectives agricoles*, no 440, pp. 20-23.

Gigot, C. (2013) - Potentialités des associations de variétés pour limiter la progression épidémique de la septoriose du blé: rôle des mécanismes de dispersion des spores par la pluie dans un couvert végétal hétérogène - Doctoral dissertation, AgroParisTech.

Gigot, C., De Vallavieille-Pope, C., Huber, L., Saint-Jean, S. (2014) - Using virtual 3-D plant architecture to assess fungal pathogen splash dispersal in heterogeneous canopies: a case study with cultivar mixtures and a non-specialized disease causal agent - *Annals of botany*, vol. 114, no 4, pp. 863-876.

Gigot, C., Saint-Jean, S., Huber, L., Maumené, C., Leconte, M., Kerhornou, B., Vallavieille-Pope, C. (2013) - Protective effects of a wheat cultivar mixture against splash-dispersed *septoria tritici* blotch epidemics - *Plant Pathology*, vol. 62, no 5, pp. 1011-1019.

Gisi, U., Hermann, D., Ohl, L., Steden, C. (1997) - Sensitivity profiles of *Mycosphaerella graminicola* and *Phytophthora infestans* populations to different classes of fungicides - *Pesticide Science*, vol. 51, no 3, pp. 290-298.

Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., McCaffery, A. (2002) - Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides - *Pest management science*, vol. 58, no 9, pp. 859-867.

Gouache, D. (2010) - Positionnement des traitements ciblant la septoriose : un enjeu de 5 q/ha - *Perspectives agricoles*, no 365, pp. 42-45.

Gouache, D., Hourcade, D., Lebrun, M. H., Marcel, T., Gout, L., Ducasse, A., ... Michelet, C. (2013) - Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *mycosphaerella graminicola* - 2013; FSOV 2008-2011, Paris, FRA, 2013-03-15-2013-03-15, p. 93.

Hawkins, N. J., Fraaije, B. A. (2016) - Predicting resistance by mutagenesis: lessons from 45 years of MBC resistance - *Frontiers in microbiology*, vol. 7, p. 1814.

Heick, T. M., Justesen, A. F., Jørgensen, L. N. (2017) - Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region-a status - *European Journal of Plant Pathology*, vol. 149, no 3, pp. 669-682.

Heick, T. M., Justesen, A. F., Jørgensen, L. N. (2017) - Anti-resistance strategies for fungicides against wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* with focus on DMI fungicides - *Crop protection*, vol. 99, pp. 108-117.

Huf, A., Rahfus, A., Lorenz, K. H., Bryson, R., Voegelé, R. T., Stämmler, G. (2018) - Proposal for a new nomenclature for CYP 51 haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe - *Plant Pathology*.

Hunter, T., Coker, R. R., Royle, D. J. (1999) - The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of septoria tritici blotch on winter wheat in the UK - *Plant pathology*, vol. 48, no 1, pp. 51-57.

INRA, ANSES, ARVALIS (janvier 2018) – Note commune 2018 – Institut du végétal pour la gestion de la résistance aux fongicides utilisés pour lutter contre les maladies des céréales à paille.

Jørgensen, L. N., Matzen, N., Hansen, J. G., Semaskiene, R., Korbas, M., Danielewicz, J., ... Hess, M. (2018) - Four azoles' profile in the control of Septoria, yellow rust and brown rust in wheat across Europe - *Crop Protection*, vol. 105, pp. 16-27.

Kema, G. H., Verstappen, E. C., Todorova, M., Waalwijk, C. (1996) - Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola* - *Current genetics*, vol. 30, no 3, pp. 251-258.

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*, vol. 86, no 7, pp. 777-786.

Kirikyali, N., Diez, P., Luo, J., Hawkins, N., Fraaije, B. A. (2017) - Azole and SDHI sensitivity status of *Zymoseptoria tritici* field populations sampled in France, Germany and the UK during 2015 - *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VIII*, pp. 153-158.

Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A. S. (2007) - Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola* - *Pest management science*, vol. 63, no 7, pp. 688-698.

Leroux, P., Bach, J., Debieu, D., Fillinger, S., Fritz, R., Walker, A. S. (2008) - Mode of action of sterol biosynthesis inhibitors and resistance phenomena in fungi - In *Modern fungicides and antifungal compounds V: 15th International Reinhardtsbrunn Symposium*, Friedrichroda, Germany, May 6-10, 2007, pp. 85-92.

Leroux, P., Walker, A. S. (2011) - Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola* - *Pest Management Science*, vol. 67, no 1, pp. 44-59.

Linde, C. C., Zhan, J., McDonald, B. A. (2002) - Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents - *Phytopathology*, vol. 92, no 9, pp. 946-955.

- Lovell, D. J., Hunter, T., Powers, S. J., Parker, S. R., Van den Bosch, F. (2004) - Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions - Plant Pathology, vol. 53, no 2, pp. 170-181.
- Lovell, D. J., Parker, S. R., Hunter, T., Royle, D. J., Coker, R. R. (1997) - Influence of crop growth and structure on the risk of epidemics by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) in winter wheat - Plant pathology, vol. 46, no 1, pp. 126-138.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., Fraaije, B. A. (2015) - The evolution of fungicide resistance - Advances in applied microbiology - Academic Press, Vol. 90, pp. 29-92.
- Mas, E. (2009) - Terre-Net : Septoriose : Zoom sur l'ennemi n° 1 du blé - <https://www.terre-net.fr/observatoire-technique-culturelle/strategie-technique-culturelle/article/septoriose-ble-maladie-bayer-217-54953.html>
- McDonald, B. A., Linde, C. (2002) - Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance – Annual review of phytopathology, vol. 40, no 1, pp. 349-379.
- McMullen, M. P., Adhikari, T. B. (2016) - Fungal Leaf Spot Diseases of Wheat: Tan Spot, Septoria/stagonospora Nodorum Blotch and Septoria Tritici Blotch - NDSU Extension Service, North Dakota State University.
- Mehta, Y.R. (2014) - Wheat Diseases and Their Management - Springer International Publishing - pp. 151-168.
- Mille, B., Fraj, M. B., Monod, H., de Vallavieille-Pope, C. (2006) - Assessing four-way mixtures of winter wheat cultivars from the performances of their two-way and individual components - European Journal of Plant Pathology, vol. 114, no 2, pp. 163-173.
- Morais, D. (2015) - Les déterminants des phases épidémiques précoces de la septoriose du blé (*Zymoseptoria tritici*): quantité, efficacité et origine de l'inoculum primaire - Sciences du Vivant [q-bio], AgroParisTech.
- Morais, D., Laval, V., Sache, I., Suffert, F. (2015) - Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (*Septoria tritici* blotch) on wheat leaves - Plant Pathology, vol. 64, no 6, pp. 1429-1439.
- Moreau, J. M., Maraite, H. (2000) - Development of an interactive decision-support system on a Web site for control of *Mycosphaerella graminicola* in winter wheat - EPPO Bulletin, vol. 30, no 1, pp. 161-163.
- Mundt, C. C., Brophy, L. S., Schmitt, M. S. (1995) - Choosing crop cultivars and cultivar mixtures under low versus high disease pressure: A case study with wheat - Crop Protection, vol. 14, no 6, pp. 509-515.
- O'Sullivan, E., Kildea, S., Teagasc, O. P. (2010) - Sensitivity of Septoria to fungicides, what's new - In National Tillage Conference, pp. 50-59.
- Omrane, S., Sabine, H. F. D., Walker, A. S. (2012) - Caractérisation du mécanisme MDR (Multidrug resistance) chez les souches de *Mycosphaerella graminicola* fortement résistantes aux fongicides IDM - In AFPP-10ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, pp. 110.

- Omrane, S., Sghyer, H., Audéon, C., Lanen, C., Duplaix, C., Walker, A. S., Fillinger, S. (2015) - Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates - *Environmental microbiology*, vol. 17, no 8, pp. 2805-2823.
- 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*, vol. 2, no 5, pp. e00393-17.
- Palmer, C. L., Skinner, W. (2002) - *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics - *Molecular Plant Pathology*, vol. 3 no 2, pp. 63-70.
- Parker, J. E., Warrilow, A. G., Cools, H. J., Martel, C. M., Nes, W. D., Fraaije, B. A., ... Kelly, S. L. (2011) - Mechanism of binding of prothioconazole to *Mycosphaerella graminicola* CYP51 differs from that of other azole antifungals - *Applied and environmental microbiology*, vol. 77, no 4, pp. 1460-1465.
- Ponomarenko, A., Goodwin, S. B., Kema, G. H. J. (2011) - *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat - *Plant Health Instructor*, vol. 10.
- Quaedvlieg, W., Kema, G. H. J., Groenewald, J. Z., Verkley, G. J. M., Seifbarghi, S., Razavi, M., ... Crous, P. W. (2011) - *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts - *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, vol. 26, pp. 57.
- Regnault-Roger, C. (2014) - Produits de Protection des Plantes : Innovation et sécurité pour une agriculture durable - Lavoisier – pp. 368.
- Rehfus, A., Strobel, D., Bryson, R., Stammler, G. (2018) - Mutations in *sdh* genes in field isolates of *Zymoseptoria tritici* and impact on the sensitivity to various succinate dehydrogenase inhibitors - *Plant Pathology*.
- Robin, M. H. (2013) - Analyse et modélisation des effets des pratiques culturales et de la situation de production sur les dégâts causés par les bioagresseurs des cultures. Application au blé d'hiver - Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Rocher, F. (2004) - Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense - Doctoral dissertation, Université de Poitiers.
- Saint-Jean, S., Chelle, M., Huber, L. (2004) - Modelling water transfer by rain-splash in a 3D canopy using Monte Carlo integration - *Agricultural and Forest Meteorology*, vol. 121, no 3-4, pp. 183-196.
- Sánchez-Vallet, A., Saleem-Batcha, R., Kombrink, A., Hansen, G., Valkenburg, D. J., Thomma, B. P., Mesters, J. R. (2013) - Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization - *ELIFE*, vol. 2.
- Sanderson, F. R. (1972) - A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. - *New Zealand Journal of Botany*, vol. 10, no 4, pp. 707-709.
- Sanderson, F. R., Hampton, J. G. (1978) - Role of the perfect states in the epidemiology of the common *Septoria* diseases of wheat - *New Zealand Journal of Agricultural Research*, vol. 21, no 2, pp. 277-281.
- Scott, P. R., Sanderson, F. R., Benedikz, P. W. (1988) - Occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici*, on wheat debris in the UK - *Plant Pathology*, vol. 37, no 2, pp. 285-290.

- Shaw, M. W., Royle, D. J. (1989) - Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK - Plant Pathology, vol. 38, no 1, pp. 35-43.
- Shaw, M. W., Bearchell, S. J., Fitt, B. D., Fraaije, B. A. (2008) - Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola* - New Phytologist, vol. 177, no 1, pp. 229-238.
- 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, vol. 42, no 6, pp. 882-899.
- Shearer, B. L., Wilcoxson, R. D. (1978) - Variation in the size of macrospores and pycnidia of *Septoria tritici* on wheat - Canadian Journal of Botany, vol. 56, no 7, pp. 742-746.
- Shetty, N. P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G. H., Collinge, D. B., Jørgensen, H. J. L. (2007) - Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat - New Phytologist, vol. 174, no 3, pp. 637-647.
- Shipton, W. A., Boyd, W. R. J., Rosielle, A. A., Shearer, B. I. (1971) - The common *Septoria* diseases of wheat - The Botanical Review, vol. 37, no 2, pp. 231-262.
- Simón, M. R., Cordo, C. A., Castillo, N. S., Struik, P. C., Börner, A. (2012) - Population structure of *Mycosphaerella graminicola* and location of genes for resistance to the pathogen: recent advances in Argentina - International Journal of Agronomy, vol. 2012.
- Stammler, G., Carstensen, M., Koch, A., Semar, M., Strobel, D., Schlehuber, S. (2008) - Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and field efficacy - Crop Protection, vol. 27, no 11, pp. 1448-1456.
- Stammler, G., Semar, M. (2011) - Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance - EPPO Bulletin, vol. 41, no 2, pp. 149-155.
- Strobel, D., Bryson, R., Stammler, G. (2017) – Field performance of DMI fungicides against *Zymoseptoria tritici* across Europe: compromised by further sensitivity shift? – Modern Fungicides and Antifungal Compounds, vol. 8, pp. 349-354.
- Steinberg, G. (2015) - Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection - Fungal Genetics and Biology, vol. 79, pp. 17-23.
- Suffert, F., Sacke, I. (2011) - Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe - Plant Pathology, vol. 60, no 5, pp. 878-889.
- Suffert, F., Sacke, I., Lannou, C. (2011) - Early stages of *Septoria tritici* blotch epidemics of winter wheat: Build-up, overseasoning, and release of primary inoculum - Plant Pathology, vol. 60, no 2, pp. 166-177.
- Thomas, M. R., Cook, R. J., King, J. E. (1989) - Factors affecting development of *Septoria tritici* in winter wheat and its effect on yield - Plant Pathology, vol. 38, no 2, pp. 246-257.
- Torriani, S. F., Brunner, P. C., McDonald, B. A., Sierotzki, H. (2009) - QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola* - Pest management science, vol. 65, no 2, pp. 155-162.

Torriani, S. F., Melichar, J. P., 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, vol. 79, pp. 8-12.

Walker, A. S. (2011) - Fongicides. Les SDHI : une nouvelle famille pour protéger les céréales - Perspectives Agricoles, vol. 384, pp. 38-39.

Wieczorek, T. M., Berg, G., Semaškienė, R., Mehl, A., Sierotzki, H., Stammer, G., ... Jørgensen, L. N. (2015) - Impact of DMI and SDHI fungicides on disease control and CYP51 mutations in populations of *Zymoseptoria tritici* from Northern Europe - European journal of plant pathology, vol. 143, no 4, pp. 861-871.

Yamashita, M., Fraaije, B. (2018) - Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici* - Pest management science, vol. 74, no 3, pp. 672-681.

Caractérisation de la résistance de *Zymoseptoria tritici* aux Inhibiteurs de la déméthylation dans la population belge

Présenté par Lucas Yzerbyt

Résumé La septoriose, causée par l'agent pathogène *Zymoseptoria tritici*, est une maladie fongique causant chaque année des pertes de rendement non négligeables d'une des céréales les plus cultivées au monde, le blé. Aujourd'hui, le contrôle de ce champignon repose principalement sur l'application de fongicides à des stades de croissance spécifiques de la plante. Plusieurs familles de fongicides existent pour lutter contre la maladie, cependant le potentiel évolutif important de l'espèce lié à sa grande capacité de reproduction asexuée et sexuée et de dissémination ont induit une perte totale de l'efficacité de la plupart d'entre elles. Ceci est le cas notamment pour les strobilurines (QoIs) et les dérivés de benzimidazole (MBCs) où des modifications alléliques, affectant le/les site(s) d'action des fongicides, ont conduit à l'apparition de souches fortement résistantes face à ces produits.

Depuis plusieurs décennies, les inhibiteurs de la déméthylation (DMIs), sont incontournables dans la protection des cultures de blé. La large gamme de substances actives de cette famille permet à celle-ci de conserver une efficacité correcte en champ. En effet, malgré la découverte de multiples mutations au sein du gène cible, le gène CYP51, aucune souche complètement résistante n'a été détectée pour le moment. En revanche, de plus en plus d'études montrent une hausse du nombre de souches faiblement à moyennement résistantes face aux divers DMIs employés en Belgique et dans d'autres pays européens. Le nombre de génotypes différents a également augmenté avec une tendance plus grande des souches à porter plusieurs mutations à la fois au sein de leur gène CYP51.

Notre étude s'est concentrée sur l'évolution de la sensibilité de populations belges de *Z. tritici* face à deux DMIs, le tébuconazole et le prothioconazole, de 2008 à 2017. Les tests de sensibilité *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'évolution significative de la résistance dans les populations belges de *Z. tritici* face au prothioconazole entre 2008 et 2017. Cela n'a pas été le cas pour le tébuconazole pour lequel il semblerait que le niveau de résistance face à cette matière active ait atteint une valeur limite au sein des populations belges de *Z. tritici* depuis 2008. Suite au séquençage du gène CYP51 de 27 souches, 11 mutations du gène CYP51 par rapport à une souche de référence sensible ont été révélées au cours de ce travail. Dix d'entre elles sont connues et tous les génotypes étudiés ont été associés à un profil phénotypique de résistance moyen (TriMR) avec la majorité des souches étant associées au phénotype TriR11/E4. La 11^{ème} mutation R177C observée dans une souche belge de *Z. tritici* est rapportée pour la première fois à travers ce travail. Elle ne semble néanmoins pas être associée à un niveau de résistance élevé aux deux DMIs étudiés.

Notre analyse sur la performance des traitements fongicides en champ réalisée dans ce mémoire soutient l'efficacité des schémas de traitement basés sur l'application de fongicides issus de familles différentes, comme l'association de l'époxiconazole (DMI) à du fluxapyroxad (SDHI). Nos résultats confirment que le choix des matières actives sur le changement de comportement de *Z. tritici* ainsi que leurs moments d'application et leurs doses sont des facteurs primordiaux dans la lutte contre la septoriose et nécessitent davantage une attention particulière à l'avenir.

L'impact du niveau de résistance d'une souche de *Z. tritici* sur sa valeur sélective, étudié dans la troisième partie de ce travail, n'a pas pu clairement être mis en évidence. Nos observations soulignent cependant l'importance du choix variétal dans la lutte contre la septoriose.

Les résultats présentés dans ce mémoire de fin d'études ont permis de mettre à jour la situation actuelle de la résistance de *Z. tritici* en Belgique aux DMIs et encouragent la poursuite des recherches relatives au sujet étudié et sur l'ensemble des familles chimiques de fongicides dans la perspective de développer des stratégies efficaces limitant le développement des résistances.