

dossier

Fusarioses sur blé d'hiver au Grand-Duché de Luxembourg

Premiers résultats d'une enquête commencée en 2007 sur l'identification des agents de la fusariose

Frédéric Giraud*, M. Pasquali*, C. Vrancken*, E. Cocco*, F. Munaut**, M. El Jarroudi***, T. Bohn*, L. Hoffmann* et P. Delfosse*

Trois instituts de recherche [Centre de recherche public Gabriel-Lippmann (CRP-GL), Université de Liège-Campus d'Arlon et Université catholique de Louvain] se sont associés pour surveiller la présence de la fusariose des céréales au Grand-Duché de Luxembourg. Ceci dans le cadre du projet *Fusarium* et mycotoxines (FUSATOX). Nous publions ici le résultat d'une année d'observation et de recherche sur les agents responsables de cette maladie sur blé d'hiver. En effet, une bonne connaissance de ce complexe pathogène — dont l'expression est tributaire d'un grand nombre de facteurs — est désormais indispensable pour envisager une stratégie de lutte efficace et compatible avec un développement durable.

Le blé d'hiver est la culture la plus importante (11 947 ha de froments d'hiver) au Grand-Duché de Luxembourg ; en 2006, la prairie couvre 10 480 ha. Or le blé est sujet à des maladies cryptogamiques dont la fusariose. Celle-ci est provoquée par des champignons appartenant surtout au genre *Fusarium* et dont certains sont capables de produire des mycotoxines pouvant représenter un risque pour la santé humaine ou animale.

La présence et la quantité de mycotoxines dans les blés d'hiver à la récolte constituent des critères déterminants de la qualité des grains, notamment depuis l'abaissement par l'Union européenne des limites de tolérances de mycotoxines et l'entrée en application en 2007 de la réglementation CE n° 1881/2006. Les toxines produites par les *Fusarium* sp. sont diverses : trichothécènes des groupes A et B, zéaralénone (ZON) et fumonisines. Elles peuvent avoir un niveau d'occurrence et de prévalence élevé dans les céréales à la récolte puis en conservation (Champeuil *et al.*, 2004).

Jusqu'à présent, aucune donnée n'était disponible au Grand-Duché de Luxembourg sur les espèces de *Fusarium* présentes et les types de mycotoxines que ces champignons produisent. L'un des objectifs du projet FUSATOX est d'améliorer nos connaissances sur les *Fusarium* sp. et d'élaborer tout le long de la chaîne

Tableau 1 - Positionnement de l'année 2007 par rapport aux températures moyennes enregistrées à la station du Findel (Luxembourg-Ville) depuis 1961.

| Hiver (décembre, janvier, février) | Printemps (mars, avril et mai) |
|------------------------------------|--------------------------------|
| 2007 : 3,9 °C | 2007 : 11,9 °C |
| 1971-2000 : 1,2 °C | 1971-2000 : 8,3 °C |
| 2000-2007 : 2 °C | 2000-2007 : 9,7 °C |

alimentaire un système intégré de gestion du risque lié à la présence des mycotoxines.

2007, année très favorable à la fusariose !

L'année 2007 ayant été particulièrement favorable au développement de la fusariose, nous avons dessiné la carte de sa présence dans le pays (mesure de sévérité et de prévalence), identifié les champignons responsables de la maladie et, enfin, mesuré le niveau de mycotoxines dans les grains des sites étudiés.

La campagne 2006-2007 a été caractérisée notamment par un hiver doux permettant le développement de nombreuses maladies cryptogamiques telles que la septoriose, les rouilles et les fusarioses des feuilles et des grains. Une comparaison des normales saisonnières (Tableau 1) montre bien la relative

Ci-contre, site de Christnach. C'est le n° 8 des 17 sites étudiés en 2007 au Luxembourg. En médaillon, détail d'Everlange, le site n° 2.



* Département Environnement et Agro-biotechnologies (EVA), CRP-Gabriel Lippmann, L-4422 Belvaux, Luxembourg.

** BCCM-MUCL, Université catholique de Louvain, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

*** Département Sciences et Gestion de l'Environnement, Université de Liège, B-6700 Arlon, Belgique.

douceur de l'hiver (2,7 °C au-dessus de la moyenne trentennale 1971-2000).

S'y ajoutent de fortes pluies en mars, puis des températures d'avril supérieures à la moyenne saisonnière suivies de pluies (variant localement de 13 à 62 mm avec une moyenne nationale de 38 mm) durant la période de floraison du 21 mai au 9 juin. Le stade BBCH 65 (BASF, Bayer, Ciba-Geigy et Hoechst, Landshare *et al.*, 1991) se situait en général au 3 juin.

Toutes ces conditions météorologiques particulières étaient favorables à un fort développement de la fusariose.

17 sites d'études pour couvrir le Luxembourg

Malgré une taille relativement réduite, le G-D de Luxembourg présente des situations topoclimatiques contrastées entre l'Oesling (nord) et le Gutland (sud), entre l'est et l'ouest. Au total, 17 sites ont été choisis dont 4 expérimentaux (Figure 1) pour permettre de couvrir raisonnablement l'ensemble des districts luxembourgeois (Diekirch, Grevenmacher et Luxembourg).

Un questionnaire a été envoyé aux agriculteurs dont les parcelles ont été sélectionnées pour notre étude afin de mieux connaître leurs pratiques. L'ensemble est résumé dans le tableau 2.

Les précédents culturaux constituent l'un des éléments clés de compréhension de la présence et du développement de la fusariose dans un champ, ainsi que de la teneur en mycotoxines (la combinaison précédent cultural/travail du sol peut expliquer jusqu'à 32 % des taux de

déoxynivaléol (DON) sur les grains de blé tendre, Decoin *et al.*, 2007). 7 de nos sites ont un précédent maïs, 3 un précédent colza, 8 des précédents céréales (blé, orge d'hiver, etc). Le blé d'hiver est en général semé au Luxembourg entre fin septembre et le 20 octobre.

Pour le travail du sol, de façon générale, les agriculteurs utilisent le labour. Cependant, il existe des différences régionales : dans la Moselle, on effectue deux passages avec Cover Crop (Grubler) suivis d'un passage avec herse rotative. Ce travail est réduit si le précédent cultural est le colza ou pour éviter le glaçage.

Les variétés ont des indices de résistance moyens à la fusariose : entre 4 et 5 sur une échelle allant de 1 (très résistant) à 9 (sensible), sauf les variétés Bussard et Enorm (indice 3).

Prévalence et sévérité de la fusariose

En 2007, les observations au champ ont montré que la maladie était présente non seulement sur les épis maïs aussi sur les feuilles.

Pour les épis, des mesures de prévalence (pourcentage d'épis touchés par la maladie, calculé sur 400 épis) et de sévérité (pourcentage d'épillets fusariés par épis) ont été réalisées sur les 17 sites au stade BBCH 85, indiquant une prévalence moyenne de 8,9 +/- 15,5 % et une sévérité moyenne de 21 +/- 17,8 %.

Figure 1 - Localisation des sites échantillonnés durant la saison 2006-2007.



Tableau 2 - Pratiques agricoles des 17 sites participant à l'enquête sur la présence de la fusariose au champ au Grand-Duché de Luxembourg (en gras, les sites expérimentaux).

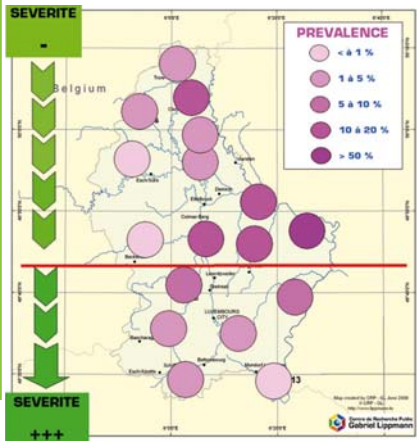
| N° du site | Localisation | Coordonnées géographiques | | Variétés | Précédent cultural | Date de semis | Calendrier des pulvérisations fongicides | Traitements fongicides |
|------------|-------------------|---------------------------|--------------|----------|--------------------|---------------|--|--|
| | | Nord GPS | Est GPS | | | | | |
| 1 | Dondelange | 49° 40' 37,2" | 6° 02' 30,9" | Bussard | maïs | octobre 2006 | 1 ^{er} nœud-dern. f. 2 ^e nœud-épiaison | 0,5 l/ha d'Opus + 0,7 l/ha de Sportak 0,3 l/ha d'Acanto + 0,8 l/ha de Caramba |
| 2 | Everlange | | | Flair | pois | 10 oct. 2006 | 03/05/07 | 1,6 l/ha Input pro set + 1 l/ha Bravo |
| 3 | Nothum | 49° 56' 41,2" | 5° 52' 39,1" | Achat | ? | octobre 2006 | ? | ? |
| 4 | Hamiville | 50° 02' 15,5" | 5° 53' 15,7" | Flair | colza | octobre 2006 | - | Pas de fongicide |
| 5 | Reuler | 50° 03' 53,6" | 6° 03' 12,8" | Akteur | maïs | 7 oct. 2006 | 18/04/2007 5/06/2007 | 1,6 l/ha Input pro set + 1 l/ha Bravo 1,6 l/ha Input pro set + 1 l/ha Bravo |
| 6 | Lipperscheid | 49° 55' 55,8" | 6° 05' 03,8" | ? | maïs | octobre 2006 | | Pas de fongicides - |
| 7 | Reisdorf | 49° 51' 49,2" | 6° 16' 39,4" | ? | ? | | | ? |
| 8 | Christnach | | | Tommi | maïs | 12/10/06 | 17/04/07 23/05/07 | 0,75 l/ha Opus team + 1 l/ha Bravo 1,6 l/ha Input pro set + 1 l/ha Bravo |
| 9 | Essingen | 49° 46' 26,7" | 6° 06' 35,6" | Urban | maïs | 16/10/06 | 25/05/07 | 0,8 l Opus team + 0,5 l Sportak + 0,5 l Bravo |
| 10 | Contern | 49° 34' 41,7" | 6° 12' 52,7" | Aron | blé | 25/09/06 | 12/04/07 21/05/07 | 2 l Stereo 0,5 l Opera + 0,8 l Opus team |
| 11 | Echternach | 49° 47' 43" | 6° 25' 33,3" | Aron | maïs | octobre 2006 | 1 ^{er} nœud-floraison 2 ^e nœud-épiaison | 1,2 l/ha d'Input 1 l/ha de Bravo |
| 12 | Oberdonven | 49° 38' 58,8" | 6° 23' 36" | Enorm | colza | 12/10/06 | 16/04/07 | 1 l Fandango |
| 13 | Burmerange | | | Cubus | colza | 11/10/06 | 17/04/07 23/05/07 | 0,75 l/ha Opus team + 1 l/ha Bravo 1,6 l/ha Input pro set + 1 l/ha Bravo |
| 14 | Kayl | 49° 29' 13,4" | 6° 01' 34,5" | ? | maïs | 10/10/06 | 1 ^{er} nœud-dern. f. dernière f.-épiaison | 0,5 l Opera + 0,7 l Dequim 1 l/ha de Caramba |
| 15 | Dippach | 49° 35' 41,6" | 5° 59' 15,7" | Exclusiv | triticale | octobre 2006 | | Pas de fongicide |
| 16 | Troisvierges | 50° 08' 03" | 6° 00' 32" | ? | ? | octobre 2006 | ? | ? |
| 17 | Hoscheid | 49° 58' 53,3" | 6° 05' 25" | Rosario | colza | octobre 2006 | 14/04/07 02/06/07 | 1,5 l de Stereo 0,8 l de Prosaro + 0,25 l de Sphere |

Sévérité forte au sud, prévalence forte après maïs

Ces mêmes mesures ont montré également des situations contrastées dans le pays : la sévérité est significativement plus basse (Test de Mann-Whitney, $P < 0,05$) dans les cantons du nord (13,4 +/- 13,1 %, écart 0,01-46,4) que dans ceux situés au sud de la ville de Luxembourg (35,1 +/- 18,1 %, écart 6,2-61,9, Figure 2).

Enfin, la prévalence de la fusariose est significativement plus élevée (Test de Mann-Whitney, $P < 0,05$) si le précédent cultural est le maïs (précédent cultural le plus risqué pour la présence de *Fusarium* et fusatoxines), comparé aux autres précédents (5,9 +/- 1,6 % contre 3,3 +/- 2,2 %, Figure 2).

Figure 2 - Prévalence et sévérité de la fusariose observées dans le G-D de Luxembourg en 2007. Le trait rouge indique la limite entre sites du nord et sites du sud.



Corrélation prévalence/DON

L'absence de corrélation entre l'intensité des symptômes et l'accumulation de mycotoxines est souvent évoquée dans les publications scientifiques (Hestbjerg *et al.*, 2002). Le rôle même de ces mycotoxines reste à l'heure actuelle incompris, ainsi que les facteurs climatiques, micro-environnementaux ou écologiques induisant leurs productions.

Bibliographie

• La bibliographie de cet article (14 références) est disponible auprès de Frédéric Giraud, giraud@lippmann.lu

Nos données montrent pour 2007 une bonne corrélation linéaire ($R^2 = 0,92$) entre prévalence de la fusariose et teneur en DON des grains.

Mais il faut rester prudent car très peu de publications mentionnent une corrélation entre observation visuelle de symptômes de fusariose de l'épi au champ et taux de mycotoxines dans le grain (Hestbjerg *et al.*, 2002).

Quelles espèces fongiques responsables de la fusariose au Luxembourg ?

Méthode d'isolement et milieux de culture

Cent grains récoltés à maturité sur chaque site sont désinfectés superficiellement dans une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % durant 3 mn, rincés successivement 3 fois avec de l'eau stérile puis séchés sous une hotte à flux laminaire. Les grains sont placés dans des boîtes de Petri (5 grains par boîte) sur un milieu DCPA (Ioos *et al.*, 2004) et incubés durant 12 jours à 22 +/- 2 °C avec photopériode de 12 heures.

Identification des espèces fusariennes

Les souches fusariennes sont transférées sur du milieu gélosé PDA et incubées à 22 °C de 6 à 10 jours. Les isolats sont identifiés selon la méthode de Nelson *et al.* (1983) confirmée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de chacune des espèces étudiées (Demeke *et al.*, 2005) ou par séquençage du gène alpha-1 du facteur d'élongation (Kristensen *et al.*, 2005).

Le chémotype des souches est déterminé selon la méthode de Starkey *et al.* (2007) en utilisant des sondes moléculaires spécifiques.

Près de 600 souches de Fusarium isolées

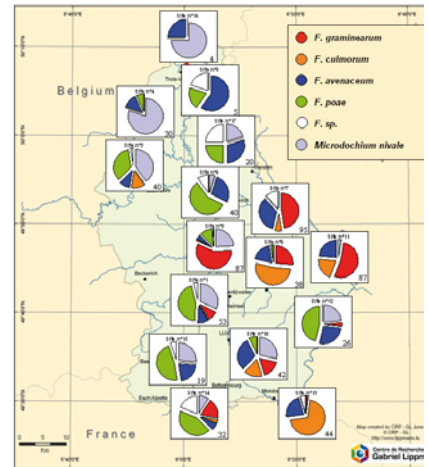
En Europe, la fusariose est provoquée par des champignons appartenant aux genres *Fusarium* et *Microdochium* (Maurin et Chenet, 1993; Chandelier *et al.*, 2003; Ioos *et al.*, 2004; Krstanovic *et al.*, 2005).

Jusqu'à présent nous ne disposons d'aucune donnée au Luxembourg. Notre étude sur un échantillonnage d'épis de blé infectés et de grains prélevés dans 17 sites luxembourgeois montre un taux d'infection moyen élevé (41 %) avec de fortes variations : de 4 % sur le site Troisvierges au nord à 95 % pour Reisdorf à l'est. Ceci indique pour 2007 une très forte contamination du blé d'hiver par *Fusarium* spp.

À ce jour, nous avons isolé 660 souches de *Fusarium*. Les 5 espèces principalement trouvées sont *Fusarium poae* (19,4 %), *F. avenaceum* (20 %), *F. graminearum* (23,5 %), *F. culmorum* (12,8 %) et *M. nivale* (18,7 %). Une carte de la présence des populations majoritaires de *Fusarium* isolées est présentée figure 3.

Figure 3 - Distribution géographique des espèces fongiques responsables de la fusariose de grains sur 17 sites étudiés au Luxembourg.

La proportion de chacune des espèces isolées est exprimée en %, le chiffre dans le cadre en bas à droite indique le nombre total de souches isolées par site.



Fusarium graminearum, espèce la plus souvent isolée, n'a pas une distribution homogène au niveau des sites : absente au nord, elle se retrouve dans l'est du pays. D'après nos tests génétiques, la majorité de ces souches appartiennent à la population des producteurs de 15 Acétyl-Déoxynivalénol (15 Ac-DON) ; les souches productrices de nivalénol (NIV) ne représentent que 5 à 10 % de la population totale.

Autre espèce problématique pour la production de trichothécènes : *F. culmorum*, qui est majoritaire sur deux sites (8 et 13).

F. avenaceum est trouvée distribuée dans tout le Luxembourg. Il convient certainement de mieux la surveiller car elle produit également des mycotoxines comme la moniliformine.

Enfin, *F. poae* est essentiellement retrouvée dans le sud-ouest du Luxembourg ; cette espèce reste aussi à surveiller car productrice entre autres de toxines T-2 et HT-2. Ces trichothécènes du groupe A sont plus toxiques que celles du groupe B (DON et NIV).

Mycotoxines au Luxembourg : y a-t-il un risque ?

Méthode d'analyse

Pour chaque site, 500 g de grains ont été moulus et un aliquot de 5 g est utilisé pour réaliser l'extraction par sonication avec un mélange CH₃CN/H₂O (80/20, V/V). Après filtration de la phase liquide (0,2 µm) et dilution au dixième, l'extrait est analysé par HPLC-MS/MS (Dionex, Ultimate 3000, Applied Biosystems API3200, colonne Altima HP C18 (150 x 2,1, 3 µm), phase mobile : MeOH/H₂O, 2,5 mM CH₃COONH₄).

Pour les cinq mycotoxines analysées [déoxynivalénol (DON), NIV, toxines T2 et HT2 et zéaralénone (ZON)], un rendement d'extraction

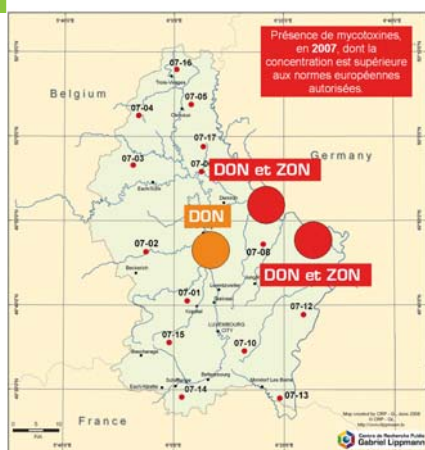
moyen de 8,19 % (de 56 % à 97 %) est obtenu. Toutes les analyses sont réalisées en double.

Fusatoxines luxembourgeoises

Les analyses révèlent une contamination de échantillons de blé principalement par deux mycotoxines de la famille des trichothécènes (DON et NIV) et par ZON avec une forte prédominance de DON (de 70 à 4 700 µg/kg). Pour les toxines T2 et HT2, les mesures effectuées ne montrent pas de valeur supérieure à la limite de quantification (LQ = 30 µg/kg).

La grande majorité des parcelles étudiées (plus de 80 %) affiche des concentrations en mycotoxines inférieures aux seuils réglementaires européens (European Guideline EC1881/ 2006) à l'exception de trois sites localisés au centre et à l'est du pays (Figure 4 et Tableau 3).

Figure 4 - Sites montrant une concentration moyenne en mycotoxines supérieure aux teneurs maximales autorisées pour les produits destinés à l'alimentation humaine (EC 1881/2006), soit 100 µg/kg pour ZON et 1 250 µg/kg pour DON.



Ces données sont à confirmer mais la présence de grandes quantités de ces mycotoxines semble fortement corrélée à la présence majoritaire de deux espèces à haut potentiel toxigénique : *F. graminearum* et *F. culmorum*.

En 2008, l'enquête continue !

L'ensemble des résultats présentés est spécifique de l'année 2007 et l'étude est actuellement poursuivie en 2008. De manière à compléter les

Remerciements : Nous remercions toute notre équipe pour le travail effectué cette année : S. Contal pour les cultures de *Fusarium* spp. et son travail graphique ; B. Untereiner pour l'extraction des mycotoxines et T. Bohn pour les analyses statistiques.

Nous remercions aussi l'ASTA (Administration des services techniques de l'agriculture) et le Lycée technique agricole d'Ettebrück pour leur collaboration à cette étude.

Ce projet a été en partie réalisé dans le cadre du projet FUSATOX financé par le Fonds national de la recherche.

données de l'année dernière, nous avons dès le début de cette saison 2008 commencé les observations dans les champs afin d'avoir un suivi sur plusieurs années de la fusariose, d'améliorer la connaissance sur l'évolution des

populations de *Fusarium* du Grand-Duché de Luxembourg et les outils prédictifs. Ceci dans l'optique de développer des stratégies de lutte les plus adéquates pour éviter la fusariose et surtout la production de mycotoxines.

Tableau 3 - Ensemble des données obtenues pour notre étude. En gras sont indiquées les valeurs les plus élevées. Pour l'analyse des mycotoxines, les valeurs des limites de quantification sont pour NIV 170 µg/kg, pour DON et T-2 35 µg/kg et pour ZON 55 µg/kg.

| | Localisation | Rendement (t/ha) | Prévalence % | Sévérité % | | Mycotoxines (mg/kg) | | |
|----|--------------|------------------|--------------|-------------|-----------------|---------------------|--------------|------------|
| | | | | moyenne | erreur standard | NIV | DON | ZON |
| 1 | Dondelange | - | 6 | 8,8 | 6,3 | < | 278 | < |
| 2 | Everlange | 7,5 | 0,3 | - | - | - | - | - |
| 3 | Nothum | - | 1 | 10 | 0 | < | 139 | < |
| 4 | Hamiville | 8 | 2,8 | 6,3 | 2,3 | < | 88 | < |
| 5 | Reuler | 9,6 | 12,7 | 21,6 | 16,7 | < | 89 | < |
| 6 | Lipperscheid | 5,5 | 2,6 | 11,5 | 5,6 | < | 74 | < |
| 7 | Reisdorf | - | 16,1 | 14,7 | 15,4 | < | 1 284 | 175 |
| 8 | Christnach | 12 | 10,2 | 16,1 | 20,2 | 293 | 501 | < |
| 9 | Essingen | 5,15 | 12,3 | 19,6 | 11,1 | < | 2 064 | < |
| 10 | Contern | 7,2 | 1 | 6,2 | 0 | < | 657 | < |
| 11 | Echternach | - | 65,8 | 46,1 | 20,5 | 213 | 4 721 | 105 |
| 12 | Oberdonven | 5,5 | 9,6 | 39,5 | 28,1 | < | 382 | < |
| 13 | Burmerange | 11,9 | 0,5 | 61,9 | 38,6 | < | 994 | < |
| 14 | Kayl | 5,5 | 3,9 | 40,8 | 26,1 | < | 365 | < |
| 15 | Dippach | 3 | 1,1 | 31,2 | 0 | < | 74 | < |
| 16 | Troisvierges | - | 1,4 | 5,5 | 0 | < | | |
| 17 | Hoscheid | 5 | 3,6 | 5,6 | 0,5 | < | 147 | < |

Résumé

Au Grand-Duché de Luxembourg, la campagne 2006-2007 a été caractérisée par un hiver relativement doux et un printemps pluvieux. Ces conditions météorologiques ont permis le développement de nombreuses maladies cryptogamiques sur le blé d'hiver, dont la fusariose.

Cette maladie a été suivie sur 17 sites couvrant le G-D de Luxembourg par des mesures de prévalence (pourcentage moyen d'épis visuellement infectés) et de sévérité (pourcentage moyen d'épillets atteints par épi). Des valeurs moyennes de 8,9 +/- 15,5 % pour la prévalence et de 21,0 +/- 17,8 % pour la sévérité ont été enregistrées avec des différences significatives entre les cantons nord et sud pour la sévérité.

Plus de 600 souches isolées des 17 sites ont été identifiées suivant des critères morphologiques et l'emploi d'outils moléculaires. 5 espèces semblent associées à la fusariose : *Fusarium graminearum* (23,5 %), *F. culmorum* (12,8 %), *F. poae* (19,4 %) (3 espèces potentiellement productrices de mycotoxines), *F. avenaceum* (20 %) et *Microdochium nivale* (18,7 %).

Cette étude est la première du genre à avoir été faite au Grand-Duché de Luxembourg.

Mot-clés : blé, fusarioses, *Fusarium* sp., mycotoxines, Grand-Duché du Luxembourg

Summary

WINTER WHEAT, FUSARIUM AND MYCOTOXINS IN LUXEMBOURG

The year 2007 was characterized by a mild winter and rainy spring. However, later during the season, weather conditions were particularly favorable for the development of a number of fungal diseases affecting winter wheat including Fusarium Head Blight (FHB). Rainfalls recorded during the flowering period (period from 21 May-09 June ; mean for GS 65 on 03 June) ranged locally from 12.7 to 61.8 mm (national mean 38.1 mm).

The occurrence of FHB was monitored in 17 sites distributed evenly over the Luxembourg territory. An overall prevalence (percentage of infected wheat spikes) of 8.9 +/- 15.5% (meanSD) and a severity (percentage of infected grains/spike) of 21.0 +/- 17.8% were recorded. A significant difference (Mann-Whitney Test, P=0.027) in FHB severity was observed between northern (13.4 +/- 13.1%, range 0.01-46.4) and southern locations (35.1 +/- 18.1%, range 6.2-61.9), indicating the importance to take regional specificities such as topoclimatological aspects into account.

From more than 600 strains originating from the 17 sites surveyed and isolated from symptomatic grains by classical microbiological techniques, the five most predominant fungal pathogens associated with FHB were *Fusarium graminearum* (23.5%), *F. culmorum* (12.8%), *F. poae* (19.4%) (3 potential trichothecene producers), *F. avenaceum* (20.0%) and *Microdochium nivale* (18.7%).

This is the first report on FHB and the associated pathogens in Luxembourg.