



**HAL**  
open science

# Étude de deux maladies chez la carotte porte-graine causées par les espèces fongiques *Fusarium tricinctum* et *Diaporthe angelicae*

Corentin Chateau

► **To cite this version:**

Corentin Chateau. Étude de deux maladies chez la carotte porte-graine causées par les espèces fongiques *Fusarium tricinctum* et *Diaporthe angelicae*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01627867

**HAL Id: dumas-01627867**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01627867>**

Submitted on 6 Nov 2017

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

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

### AGROCAMPUS OUEST

CFR Angers  CFR Rennes

Année universitaire : 2016 - 2017

Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV)

Parcours : Sélection, Production et Valorisation des Végétaux (SPVV) /

Option : Qualité et valorisation des végétaux

### Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

## Etude de deux maladies chez la carotte porte-graine causées par les espèces fongiques *Fusarium tricinctum* et *Diaporthe angelicae*

Par : CHATEAU Corentin



**Soutenu à Rennes le 15/09/17**

**Devant le jury composé de :**

Président : Deleu Carole

Maître de stage : Poupard Pascal (IRHS)

Enseignant référent : Gravot Antoine

Rapporteur 1 : Cabello-Hurtado Francisco

Rapporteur 2 : Bouchereau Alain

Examineur : Guyot Sylvain



## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Pascal POUPARD pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce stage au sein de l'IRHS. Merci pour votre confiance, votre disponibilité et vos précieux conseils. Je tiens également à remercier Franck BASTIDE pour son encadrement, sa patience, sa disponibilité et sa bonne humeur permanente. Merci, à tes côtés j'ai beaucoup appris tant au niveau technique que scientifique.

J'adresse également mes remerciements à la FNAMS, notamment à Julie GOMBERT, Elise MOREL et Emmanuelle LAURENT, pour leur disponibilité et leurs précieux conseils. De même, je voudrais remercier le GEVES pour son accueil et la mise à disposition de matériel pendant les quelques semaines où j'y suis aller, plus particulièrement Isabelle SERANDAT et Sylvie LECLERC.

Mes remerciements vont aussi au SCIAM, pour l'accueil et le professionnalisme de Guillaume MABILLEAU et de Rodolphe PERROT, et au SONAS, notamment pour David GUILLET. Je tenais également à remercier chaleureusement le plateau IMAC, notamment Fabienne SIMONNEAUX et Aurélia ROLLAND qui malgré un emploi du temps chargé ont toujours réussi à trouver quelques instants à m'accorder pour me former aux techniques d'histologie et de microscopie ou pour répondre à mes questions. Je vous en suis très reconnaissant.

Je remercie également Juliette KOLOPP et Aurore DALLIER de Vilmorin et Pierre-Louis GUILLERMIN de HM-Clause pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Enfin, un grand merci à l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé pendant ce stage. Merci notamment aux membres de l'équipe FungiSem, pour votre accueil, vos conseils toujours avisés (notamment en matière de résumé), votre bonne humeur et les viennoiseries avec le café. Je vous souhaite à tous une bonne continuation dans l'ensemble des projets de recherche que vous menez, que la réussite soit avec vous.



## Sommaire

I – Introduction .....	1
I.1 – Présentation de la structure d'accueil .....	1
I.2 – Présentation des partenaires du projet .....	1
I.3 – Production de semences de carotte et critères de qualité.....	2
I.4 – Etude de <i>Diaporthe angelicae</i> ( <i>Phomopsis dauci</i> ) de la carotte : projet DIAPOCAR.....	2
I.5 – <i>Fusarium tricinctum</i> , un nouveau pathogène en culture de carotte porte-graines.....	3
II – Bibliographie .....	3
II.1 – Culture bisannuelle de la carotte porte-graine.....	3
II.1.1 – Physiologie de la carotte porte-graine .....	3
II.1.2 – Cycle de développement et itinéraire cultural .....	4
II.2 – <i>Fusarium tricinctum</i> .....	5
II.2.1 – Généralités sur le genre <i>Fusarium</i> .....	5
II.2.2 – Classification de <i>Fusarium tricinctum</i> .....	5
II.2.3 – Description de <i>Fusarium tricinctum</i> .....	5
II.2.4 – Gamme d'hôtes et répartition.....	6
II.2.5 – Impact sur la carotte porte-graine.....	6
II.2.6 – Métabolites secondaires et mycotoxines .....	6
II.3 – <i>Diaporthe angelicae</i> .....	7
II.3.1 – Généralités sur le genre <i>Diaporthe</i> .....	7
II.3.2 – Description de <i>Diaporthe angelicae</i> .....	7
II.3.3 – Impact sur la carotte porte-graine.....	7
III – Objectifs de l'étude .....	8
III.1 – <i>Fusarium tricinctum</i> : analyses phénotypiques, moléculaires et méthodes de lutte .....	8
III.2 – <i>Diaporthe angelicae</i> : contaminations artificielles et localisation tissulaire .....	8
IV – Matériels et méthodes .....	9
IV.1 – Origines et entretien des souches de <i>Fusarium</i> .....	9
IV.2 – Phénotypage et Analyse moléculaire des souches.....	9
IV.3 – Lutte contre <i>F. tricinctum</i> : screening <i>in vitro</i> de fongicides par néphélométrie et tests de confrontation sur boîtes.....	10
IV.3.1 – Sporulation des souches de <i>F. tricinctum</i> .....	10
IV.3.2 – Néphélométrie.....	11
IV.3.3 – Confrontations de <i>Fusarium tricinctum</i> avec les produits de biocontrôle.....	12



IV.4 – Stade de sensibilité des carottes porte-graine à <i>Diaporthe angelicae</i> et localisation tissulaire du champignon .....	12
IV.4.1 – Entretien et sporulation de la souche DA057 .....	12
IV.4.2 – Préparation de la suspension de conidies et contaminations artificielles .....	13
IV.4.3 – Réalisation des coupes et observations microscopiques.....	13
V – Résultats .....	13
V.1 – Phénotypage et génotypage des isolats de <i>Fusarium</i> : caractérisation des souches ...	13
V.2 – Screening <i>in vitro</i> des fongicides et produits de biocontrôle pour lutter contre <i>Fusarium tricinctum</i> .....	15
V.3 – Stade de sensibilité maximale de la carotte porte-graine à <i>Diaporthe angelicae</i> .....	16
V.4 – Voies de pénétration du champignon dans l’hôte et localisation cellulaire de <i>Diaporthe angelicae</i> .....	16
VI – Discussion.....	17
VII – Conclusion et perspectives .....	20
Bibliographie.....	23
Sitographie .....	25
Annexes.....	27





## **Abréviations :**

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AOX : Alternative Oxydase

BET : Bromure d'Ethidium

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique

EFSA : European Food Safety Agency

dNTPs : Solution de quatre Désoxyribonucléotides

IgE : Immunoglobuline E

IGS : InterGenic Spacer region

ITS : Internal Transcribed Spacer

MEB : Microscope Electronique à Balayage

NSCLC : Non-Smal Cell Lung Cancer

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potatoes Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

PTS : Propyl Propanethiosulfinate

PTS-O : Propyl Propane thiosulfonate

ROS : Reactive Oxygen Species

SM : Supplemented Medium

SHAM : Acide Salicylhydroxamique

SNA : Synthetischer Nährstoffarmer Agar

TAE : Tris Acetate EDTA

UA : Unité arbitraire

VOCs : Volatil Organic Coumpounds



## I – Introduction

### I.1 – Présentation de la structure d'accueil

L'IRHS (Institut de Recherche en Horticulture et Semences) situé à Beaucouzé, est une structure récente, créée en 2012 qui se trouve sous les tutelles de l'INRA, d'AGROCAMPUS OUEST et de l'Université d'Angers. Implanté dans la région « Pays de Loire », bassin européen majeur de productions horticoles et de semences, cet institut regroupe une grande partie des acteurs de la recherche sur la biologie végétale. Environ 220 membres y travaillent (techniciens, ingénieurs, enseignants-chercheurs ...) et sont regroupés en 15 équipes qui travaillent sur de nombreux sujets d'études, notamment les rosiers et autres espèces ornementales, les fruits à pépins et légumes ainsi que les semences et pathogènes associés [1]. De plus, cet institut est une composante importante de la SFR (Structure Fédérative de Recherche) Quasav (QUALité et Santé du Végétal) et fait partie du pôle de compétitivité Végépolys. Ce pôle de compétitivité agréé en 2005 par le gouvernement français regroupe des entreprises, des laboratoires de recherche et des institutions d'enseignement supérieur afin de renforcer la compétitivité de ses acteurs par l'intermédiaire de projets d'innovation. C'est au sein de l'équipe FungiSem (Pathologies fongiques des semences), que s'est déroulé le stage. Les études qui y sont conduites sont principalement menées sur les espèces pathogènes du genre *Alternaria* transmises par les semences de Brassicacées et d'Apiacées. L'objectif de ces recherches est d'identifier des déterminants du pouvoir pathogène de ces champignons et notamment les mécanismes de protection de ce dernier contre les stress occasionnés lors de son interaction avec sa plante-hôte [1].

### I.2 – Présentation des partenaires du stage

Le laboratoire de pathologie de la SNES (GEVES, Beaucouzé) ainsi que la FNAMS (Brain sur l'Authion) ont participé au projet.

La SNES (Station Nationale d'Essais de Semences) créée en 1958 à Paris, est installée à Beaucouzé depuis 1993. Composée de 76 ingénieurs et techniciens, ce laboratoire a pour missions de contrôler la qualité des semences, d'évaluer la résistance des variétés aux bioagresseurs ainsi que de former et qualifier des professionnels de laboratoire de la filière semences. De plus, elle participe à l'animation du réseau français de laboratoire. Grâce à cette multidisciplinarité, le laboratoire de pathologie de la SNES conduit des travaux de recherche et participe également à la mise au point et à la standardisation de protocoles au niveau international en lien avec l'ISTA (International Seed Testing Association) [2].

La FNAMS (Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences) quant à elle, a été créée en 1956. Il s'agit d'une organisation professionnelle agricole spécialisée dans la multiplication de semences. Elle organise et dynamise la filière semences en représentant les agriculteurs multiplicateurs au sein de l'interprofession française des semences, le GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences et des plants). La vie de la FNAMS s'organise autour de trois grandes missions qui sont d'établir des itinéraires technico-économiques permettant l'obtention de semences de qualité tout en garantissant la rentabilité de la production, de défendre les intérêts des multiplicateurs de semences auprès des organisations professionnelles et des pouvoirs publics et enfin,

Tableau 1 : Principaux stress biotiques observés en culture de carottes porte-graine (Collin *et al.*, 2005 ; [1])

Maladies		Ravageurs	
Noms	Symptômes	Noms	Symptômes
<i>Alternaria dauci</i> (Alternariose)	Fontes des semis / Feuillage taché	<i>Graphosma lineatum</i> (Punaise Arlequin et autres punaises)	Les semences sont vidées
<i>Erysiphe umbelliferarum</i> ( <i>Oidium</i> )	Duvet blanc sur les cultures porte-graines	<i>Psila rosae</i> (mouche de la carotte)	Des galeries sont creusées dans les tiges par les larves
<i>Diaporthe angelicae</i>	Grillure d'ombelles	Limaces	Les plantules sont dévorées
<i>Alternaria radicina</i>	Fontes des semis / Partie supérieure des racines tachée de noir et s'étend jusqu'à la hampe florale	Pucerons	Ralentissement / arrêt de croissance

d'animer le réseau des agriculteurs multiplicateurs par l'intermédiaire des ingénieurs répartis dans les sept stations régionales [3].

### **I.3 – Production de semences de carotte et critères de qualité**

En 2016, la surface allouée à la production de carottes porte-graines était de 1952 ha [4]. Il est important de noter que 60 % des surfaces allouées à ces cultures sont dédiées à des variétés populations et que les 40 % restant le sont à des hybrides. Les rendements sont de 500 kg/ha pour les variétés populations et de 275 kg/ha pour les hybrides. La production de semences de carotte, considérée comme culture de potagère fine, est soumise à de nombreux stress biotiques (Tableau 1). De plus, les stress abiotiques, tels que les conditions climatiques au moment de la germination, sont aussi préjudiciables. Cela peut conduire à des baisses de rendement parfois très importantes. Pour la qualité des semences issues des parcelles de multiplication de semences, un certain nombre de normes existent :

- La pureté minimale spécifique doit être de 95 % du poids total du lot de semences.
- La teneur maximale en semences d'autres espèces doit être au maximum de 1 % du poids total.
- La faculté germinative minimale doit être de 65 % des semences pures.
- La teneur en eau des semences doit être au maximum de 9 %.

Au niveau sanitaire, des normes sont à respecter notamment sur la teneur minimale en certains ravageurs ou agents pathogènes ou la teneur en certaines toxines et mycotoxines. Ces teneurs limites sont établies en fonction des substances ou organismes considérés [5].

### **I.4 – Etude de *Diaporthe angelicae* (*Phomopsis dauci*) de la carotte :**

#### **projet DIAPOCAR**

En 2007, a été observée en France l'apparition d'un champignon pathogène ré-émergent de la carotte : *Diaporthe angelicae*. Ce champignon est responsable des grillures d'ombelles des carottes porte-graines. Suivant les conditions climatiques, les grillures peuvent apparaître précocement lors de la culture et entraîner des pertes pouvant être importantes : cela a été le cas en 2007 pour la région Centre, qui est une des premières zones de production française. En effet, une perte des surfaces de 8 % a été estimée, soit 200 000 euros de chiffres d'affaires pour les agriculteurs en contrat avec Vilmorin (Gombert, 2016).

C'est dans ce contexte qu'a été mis en place le projet DIAPOCAR en 2012. Il s'agit d'un projet qui regroupe divers acteurs de la filière semences : la FNAMS, l'IRHS, le GEVES-SNES ainsi que les entreprises semencières HMClause et Vilmorin. L'objectif commun est d'approfondir les connaissances sur ce champignon afin d'être en mesure de le contrôler le plus efficacement possible en production de semences de carotte. Pour mener à bien ce projet, trois axes ont été développés.

- Axe 1 : Création d'une collection de souches et caractérisation de la diversité génétique de *Diaporthe angelicae* : plus d'une centaine de souches ont été isolées à

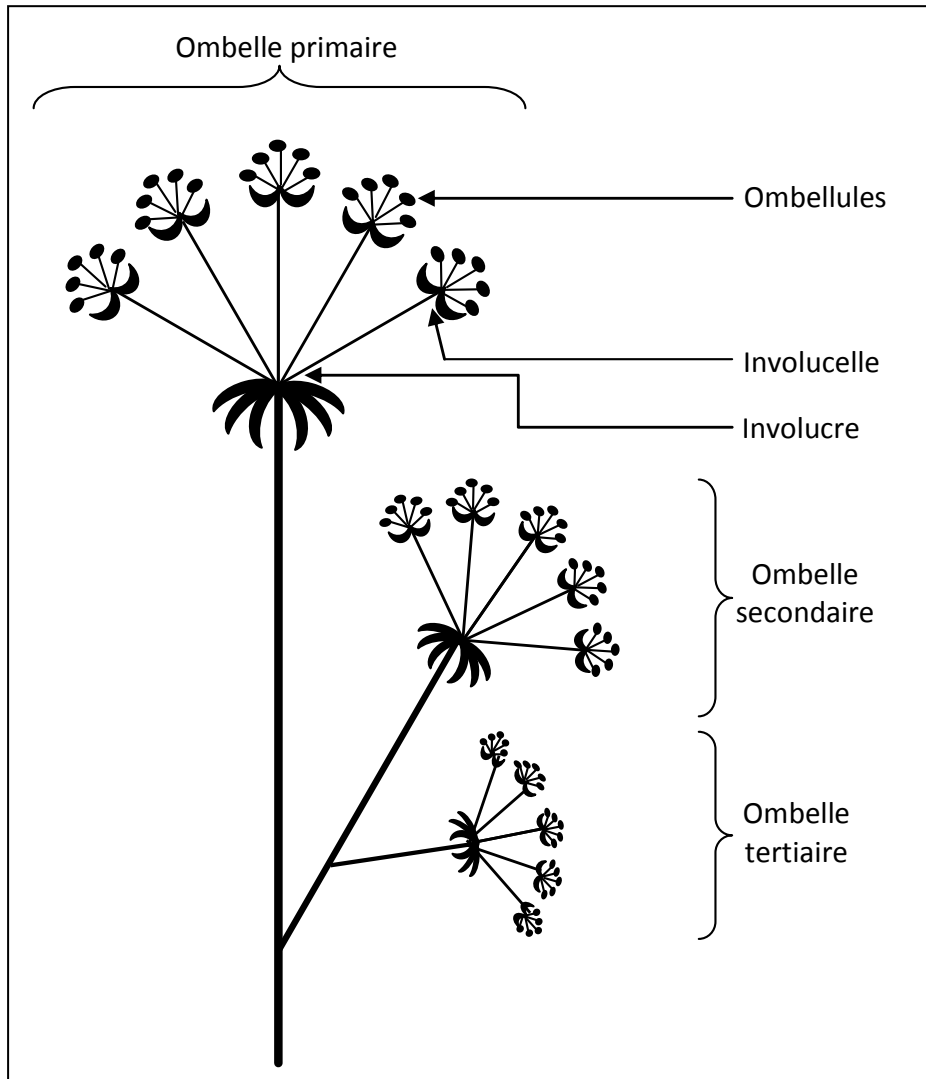


Figure 1: Morphologie de *Daucus carota* : organisation des ombelles (Chateau, 2017)

partir de plantes symptomatiques récoltées dans différentes régions géographiques et sur différentes espèces végétales. Une caractérisation génotypique et une étude de la diversité génétique de ces souches ont été réalisées par séquençage des régions intergéniques de l'ADN ribosomal.

- **Axe 2 :** Etude épidémiologique de *Diaporthe angelicae* : des méthodes d'inoculation en conditions contrôlées et au champ ont été mises en place pour réaliser des suivis de symptômes et mettre en évidence le stade de sensibilité maximale des plantes. La transmission à la semence et la présence de *D. angelicae* sur les résidus de culture ont également été étudiées dans cet axe.
- **Axe 3 :** Méthodes de lutte : Plusieurs fongicides ont été testés sur les cultures de porte-graines pour déterminer leur efficacité contre *D. angelicae*. Une importante communication a été réalisée auprès des agriculteurs multiplicateurs de semences de carottes.

## **I.5 – *Fusarium tricinctum*, un nouveau pathogène en culture de carotte porte-graines**

En 2015 ont été repérés au champ de nouveaux symptômes sur les cultures de carottes porte-graines en France. Ces symptômes ont été attribués à un champignon appartenant au genre *Fusarium* : *Fusarium tricinctum*. Dans une nouvelle collaboration avec les mêmes partenaires que pour le projet DIAPOCAR, une étude sera réalisée afin de mieux connaître ce nouveau pathogène, émergent en culture de porte-graines.

## **II – Bibliographie**















### **II.1 – Culture bisannuelle de la carotte porte-graine**

#### **II.1.1 – Physiologie de la carotte porte-graine**

La carotte, *Daucus carota* L., appartient à la famille des *Apiaceae* et possède des inflorescences de type ombelle. On distingue dans cette inflorescence des ombelles de différents ordres. Au sommet, on distingue l'ombelle primaire portée par l'axe primaire, les extrémités des ramifications sur l'axe primaire constituent les ombelles secondaires et enfin, les extrémités des ramifications sur les axes secondaires constituent les ombelles tertiaires (Carette et Jollin, 1992 ; Ravenel *et al.*, 2012) (Figure 1). Chacune des ombelles est composée d'ombellules regroupées par des involucelles, qui sont, elles-mêmes regroupées par un involucre. La floraison des ombelles est décalée dans le temps. Les ombelles primaires sont les premières à fleurir, 7 à 10 jours après, les ombelles secondaires fleurissent. Enfin, 10 à 12 jours après floraison des ombelles secondaires, les ombelles tertiaires fleurissent à leur tour. La floraison centripète démarre en périphérie externe de l'ombelle et s'achève en son centre (Carette et Jollin, 1992 ; Ravenel *et al.*, 2012). Les fleurs se composent de cinq sépales, cinq pétales, cinq étamines et d'un ovaire comprenant deux carpelles. Lors de la floraison, les fleurs passent par sept étapes de développement (Ravenel *et al.*, 2012)(Tableau 2). Les stades S0 à S3 seront utilisés dans cette étude.



Tableau 2 : Stades de développement des fleurs de carotte (Ravenel *et al.*, 2012). Le stade 2 est atteint quand 10 % des fleurs sont ouvertes. Les autres stades sont atteints quand 50 % des fleurs de l'ombelle ont atteint le stade décrit.

Stade	0	1	2	3	4	5	6	7
Aspect de la fleur								
Description	Fleurs fermées	Emission pollinique : Déhiscence progressive des anthères dès que les pétales sont déployés	Fleurs ouvertes et croissance des styles, les pétales blancs sont visibles	Réceptivité femelle : styles séparés et chute des pétales	Fécondation : grossissement des ovaires et stigmates brunis	Maturation : Développement de l'albumen puis de l'embryon, brunissement progressif de l'ombelle		
Aspect d'une ombellule								

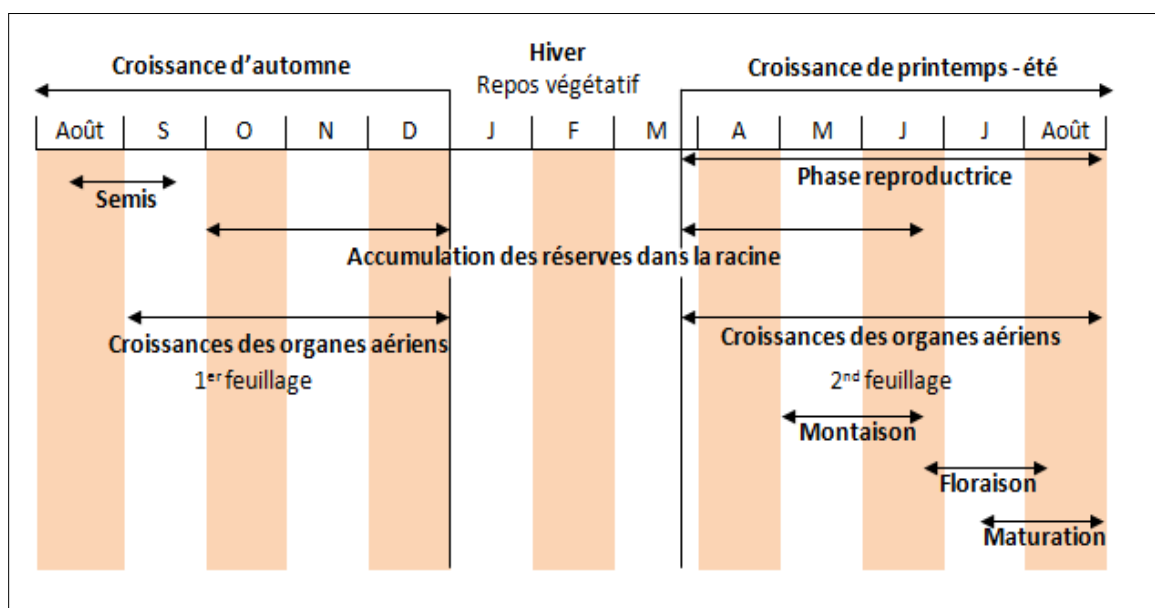


Figure 2 : Calendrier culturel de la carotte porte-graine (d'après Carette et Jollin, 1992)

La carotte possède des fleurs hermaphrodites. Il s'agit d'une espèce allogame entomophile. En effet l'autofécondation est rendue impossible par la protandrie qui oblige la fécondation croisée (la réceptivité ovarienne arrive 3 à 10 jours après l'émission du pollen) (Ravenel *et al.*, 2012). De plus, les insectes pollinisateurs (abeilles entre autres) sont donc nécessaires pour que le pollen soit transporté sur les stigmates et qu'il y ait fécondation.

Quarante jours après floraison, l'embryon atteint sa taille maximale et la semence son poids maximum. Cependant, il faut attendre 50 jours après floraison pour que les semences atteignent leur vigueur maximale (vitesse de germination et germination à des températures suboptimales). Il faut noter que l'acquisition de la qualité germinative de la graine se fait en parallèle à l'accumulation d'ombelliférone et d'acide gras (Ravenel *et al.*, 2012). L'ombelliférone, également appelé la 7-hydroxycoumarine aurait des propriétés antioxydantes et de protection contre les radiation UV, elle est également à l'origine de nombreux dérivés de la coumarine (Bruneton, 2008).

### **II.1.2 – Cycle de développement et itinéraire cultural**

Comme décrit précédemment, la culture de carotte porte-graines est relativement longue. Le calendrier de culture de la carotte porte-graines est présenté en Figure 2. Le semis est réalisé de fin août à début septembre et les nouvelles semences récoltées un an après la mise en terre. Du semis en août-septembre à décembre, une première croissance de l'appareil aérien a lieu (le premier feuillage) ainsi qu'une accumulation de réserves dans la racine. De décembre à fin mars, les organes entrent en repos végétatif. La reprise de croissance s'effectue à partir de fin mars. Durant cette période, les réserves continuent à s'accumuler au sein de la racine et un nouvel appareil aérien se met en place (second feuillage). A partir du mois de mai s'initie l'étape de montaison. Durant cette étape, les hampes florales croissent. A partir de la fin du mois de juin, les premières floraisons apparaissent. Celles-ci peuvent s'étendre sur un mois comme décrit précédemment. Enfin, après pollinisation, une étape de maturation des graines débute à partir de mi-juillet. Elle peut se poursuivre jusqu'à mi-septembre en fonction de l'étalement de la floraison. La récolte s'effectue de mi-août à mi-septembre. Il faut noter que 80% à 100% du rendement commercial provient des ombelles primaires et secondaires (Carette et Jollin, 1992).

Après récolte, les semences vont passer par différentes étapes de triage. Une première étape permet d'éliminer les déchets grossiers grâce à un pré-nettoyeur. Les bardes des semences sont ensuite ôtées grâce à une ébardeuse, et les déchets légers sont enlevés par ventilation. Enfin, les semences sont triées grâce à une colonne d'air et une table densimétrique, en se basant sur leur densité pour ne conserver que les semences correctement formées. Pour finir, le lot sera agréé selon les normes interprofessionnelles pour les semences de carotte (Carette et Jollin, 1992).

La carotte effectuant son cycle de culture en un an, elle est très sensible aux différentes saisons donc aux conditions climatiques ainsi qu'aux divers bio-agresseurs. De plus, quelques points clés sont à respecter lorsqu'une telle culture est mise en place. Il faut notamment une parcelle drainée correctement et irrigable. Les sols ne doivent pas être trop compacts pour que les racines puissent se former sans encombre pendant l'accumulation des réserves. Un travail du sol est donc nécessaire avant semis. Une distance de 1000 m est à prévoir entre deux variétés de même type et de 1500 m dans les autres cas. La nutrition en oligo-éléments est très importante pour la carotte, en effet des déficits en bore et en cuivre entraînent respectivement un brunissement des racines et une non-formation du

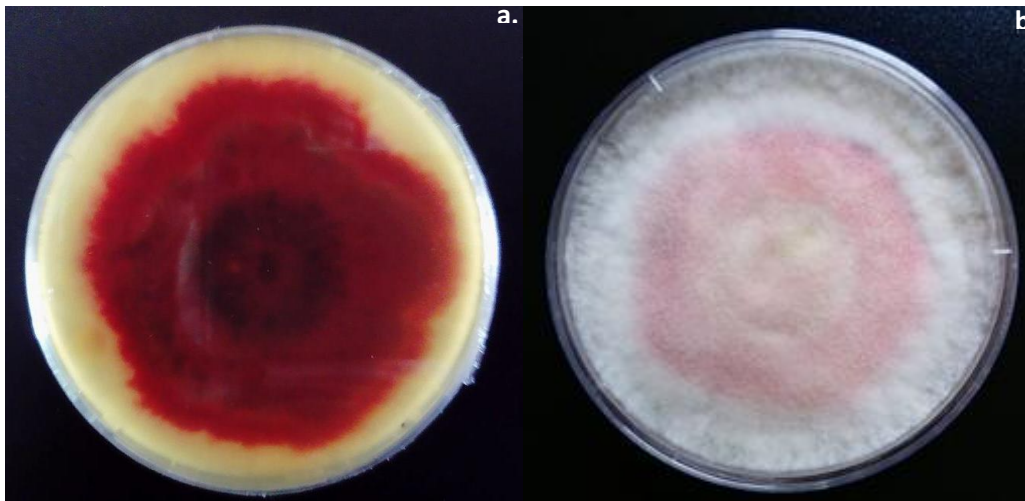


Figure 3 : Souche D1487 de *Fusarium tricinctum* cultivé sur milieu PDA, 20 jours : a : Pigmentation pourpre de la gélose (verso de la colonie), b : Colonie cotonneuse (recto de la colonie). (Chateau, 2017)

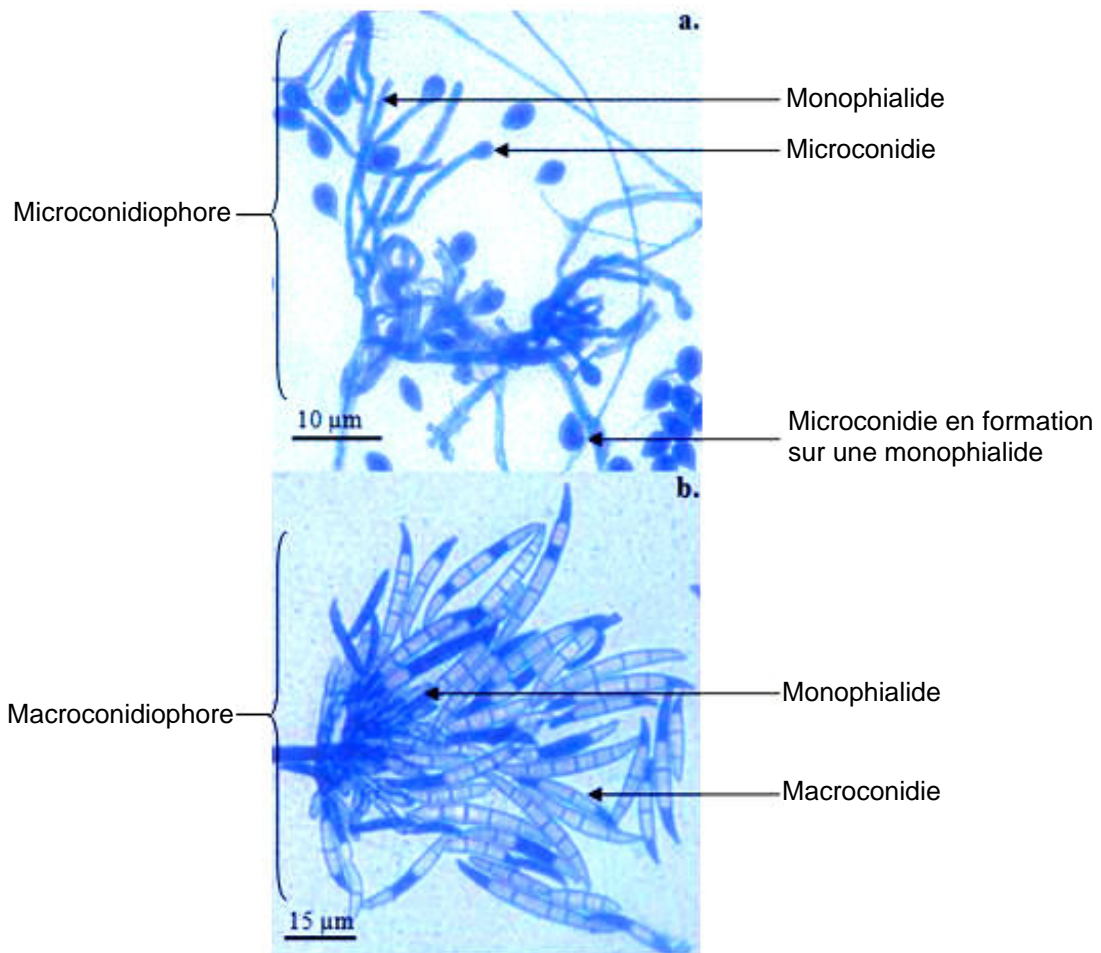


Figure 4 : Structures de reproduction de la souche de *Fusarium tricinctum* D1487 observée au microscope optique Leica DM1000 : a : Microconidiophore avec les microconidies b : Macroconidiophore avec les macroconidies. Coloration au bleu de méthyl. (Chateau, 2017)

pivot. Enfin, des traitements phytosanitaires sont préconisés, mais à raisonner en fonction des besoins de la culture (Carette et Jollin, 1992).

## **II.2 – *Fusarium tricinctum***

### **II.2.1 – Généralités sur le genre *Fusarium***

Le genre *Fusarium* regroupe des espèces de champignons filamenteux dits imparfaits. Il s'agit de la forme asexuée d'Ascomycètes connus sous le nom de *Gibberella*, *Calonectria*, *Nectria* ou *Plectosphaerella*. On compte dans le genre *Fusarium* entre 50 et 70 espèces. Un certain nombre de ces espèces sont phytopathogènes et provoquent des maladies appelées fusarioses. Les colonies formées sont généralement cotonneuses ou floconneuses, de couleur rose clair ou rouge pouvant aller jusqu'à un violet assez soutenu.

Pour les structures de reproduction, les conidiophores sont regroupés en sporodochies, formés de phialides plus ou moins allongées. Ce sont ces phialides qui produisent des microconidies (1 à 2 cellules), piriformes, fusiformes ou ovoïdes. Les phialides produisent également des macroconidies fusiformes, courbées, pluriseptées avec une cellule basale pédiculée (Nelson *et al.*, 1983 ; John et Brett, 2008).

Les espèces du genre *Fusarium* sont très communes, on peut les retrouver partout dans l'environnement (plantes, semences, sol). Certaines espèces sont saprophytes et se développent donc secondairement sur des tissus végétaux sénescents. D'autres espèces provoquent des allergies de type I (hypersensibilité immédiate en réponse aux IgE) [6]. Certaines espèces peuvent produire des mycotoxines relativement dangereuses (trichothécènes, toxine T-2, zéaralénone, vomitoxine, déoxynivalénol, fumonisine, ...). Les propriétés de certaines peuvent être utilisées : intérêt vétérinaire de la zéaralénone qui est utilisée en tant qu'anabolisant (Gaumy *et al.*, 2001).

### **II.2.2 – Classification de *Fusarium tricinctum***

*F. tricinctum*, est la forme asexuée (anamorphe) d'un champignon connu sous le nom de *Gibberella tricincta*, qui est la forme sexuée (téleomorphe). *G. tricincta* appartient à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des Hypocréales et à la famille des *Nectriaceae*.

Il ressort cependant dans la littérature que la forme asexuée, plus commune, est plus documentée. *F. tricinctum* est un champignon imparfait, qui appartient à la classe des Deutéromycètes, à l'ordre des Hypocréales et à la famille des *Nectriaceae*.

### **II.2.3 – Description de *Fusarium tricinctum***

La première description de ce champignon a été réalisée par El-Gholl *et al.*, en 1978 sur du lierre (*Hedera helix*) aux Etats-Unis. Lorsqu'il est cultivé sur milieu PDA (Potatoe Dextrose Agar), ce champignon est filamenteux et forme des colonies cotonneuses de couleur blanc-crème. Avec le temps, le mycélium devient jaune et/ou rose et des pigments pourpre colorent la gélose (Figure 3) (John et Brett, 2008).

Pour les structures de reproduction de *F. tricinctum*, on observe majoritairement des microconidies piriformes ou citriformes mesurant entre 2 et 4 µm de longueur et 2 à 3 µm de largeur. Ces microconidies sont branchées ou non sur des monophialides. On peut également observer des macroconidies d'environ 30 µm de longueur et 3 à 4 µm de largeur,

Tableau 3 : Game d'hôtes et répartition de *Fusarium tricinatum*

Familles	Hôtes	Noms communs	Provenance	Publications
Alliacées	<i>Allium cepa</i>	Oignon blanc	Allemagne, Italie	(Carrieri <i>et al.</i> , 2013 ; Boehnke <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Allium sativum</i>	Ail	Serbie	(Ignjatov <i>et al.</i> , 2016)
Araliacées	<i>Hedera helix</i>	Lierre	Etats-Unis	(El-Gholl <i>et al.</i> , 1978)
Fabacées	<i>Medicago sativa</i>	Luzerne	Chine	(Cong <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Pisum sativum</i>	Pois	Non spécifiée	(Champion, 1997)
	<i>Vicia faba</i>	Fève	Nouvelle Zélande	(Harrow <i>et al.</i> , 2010)
Liliacées	<i>Lilium spp.</i>	Lys	Chine	(Li <i>et al.</i> , 2013)
Nélumbonacées	<i>Nelumbo nucifera</i>	Lotus	Chine	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Passifloracées	<i>Passiflora edulis</i>	Fruit de la passion	Nouvelle Zélande	(Harrow <i>et al.</i> , 2010)
Poacées	<i>Avena sativa</i>	Avoine	Allemagne, Finlande	(Yli-Mattila <i>et al.</i> , 2002 ; Sundheim <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Hordeum vulgare</i>	Orge	Allemagne, Danemark, Finlande, Russie	(Niessen <i>et al.</i> , 2012 ; Yli-Mattila <i>et al.</i> , 2002 ; Sundheim <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Triticum aestivum</i>	Blé tendre	Allemagne, Autriche, France, Nouvelle Zélande	(Niessen <i>et al.</i> , 2012 ; Yli-Mattila <i>et al.</i> , 2002 ; Harrow <i>et al.</i> , 2010 ; Sundheim <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Triticum spp.</i>	Espèces du genre <i>Triticum</i>	Europe	(Champion, 1997)
	<i>Zea mays</i>	Maïs	Non spécifiée	(Champion, 1997)
Rosacées	<i>Aronia melanocarpa</i>	Aronie	Corée	(Niessen <i>et al.</i> , 2012 ; Harrow <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Malus spp.</i>	Pommiers	Canada CB, Nouvelle Zélande	(Lee <i>et al.</i> , 2016)

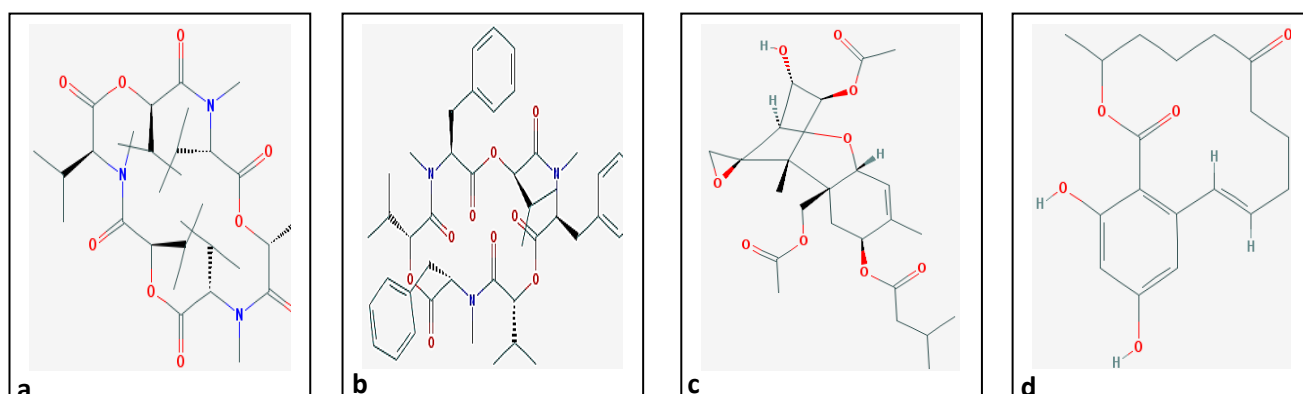


Figure 5 : Mycotoxines produites par *Fusarium tricinatum*. a : Enniatine, b : Beauvericine, c : T-2 Toxine, d : Zéaralénone (PubChem : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>)



branchées ou non sur des monophialides, courbées en forme de croissant de lune avec une cellule basale biseautée très distincte (Nelson *et al.*, 1983) (Figure 4).

#### II.2.4 – Gamme d'hôtes et répartition

Ce pathogène aurait à l'origine pour hôtes des Poacées (Muthaiyan, 2009). On retrouve cet agent pathogène notamment chez des espèces cultivées telles que le blé, l'orge et l'avoine. Cependant, depuis ces dernières années, une gamme d'hôtes plus large est décrite dans les publications (Tableau 3).

#### II.2.5 – Impact sur la carotte porte-graine

Les symptômes sont observés lors de la reprise de croissance des organes aériens après la période de repos végétatif de l'hiver. Il s'agit principalement de nécroses au collet accompagnées parfois de nécroses du feuillage. A l'intérieur, au centre de la racine, les tissus sont nécrosés. Cela entraîne le dépérissement de la carotte provoquant une perte de rendement importante. Notons néanmoins qu'actuellement, il n'y a pas de données chiffrées quant aux pertes occasionnées par ce champignon, que ce soit pour le rendement ou d'un point de vue économique.

De plus, la transmission de ce champignon à la semence est envisageable. Les spores se développent à la surface des semences et le mycélium colonise alors les parties les plus externes du tégument (Champion, 1997).

#### II.2.6 – Métabolites secondaires et mycotoxines

Comme pour la plupart des espèces du genre *Fusarium*, *F. tricinctum* est décrite dans la littérature comme productrice d'un certains nombres de mycotoxines. Même si les graines produites en production de semences ne sont pas destinées à la consommation, il est important de connaître les toxines produites par ce pathogène, qui peuvent impacter des cultures céréalières et même fruitières comme vu précédemment sur la gamme d'hôtes. En outre, certaines propriétés de ces toxines pourraient être utilisées dans le monde médical, pour des tests sur des lignées de cellules cancéreuses comme les cellules Caco-2 (originaire d'un carcinome du colon) et les NSCLC (non-small cell lung cancer) (Lin *et al.*, 2005 ; Prosperini *et al.*, 2012).

Nous pouvons premièrement aborder le cas des enniatines (Figure 5.a) (A, A1, B, B1, B4 et J1 pour *F. tricinctum*) et de la beauvericine (Figure 5.b) principalement connues pour leur activité inhibitrice de la cholestérol-acyltransférase, importante dans le métabolisme du cholestérol (Tomoda *et al.*, 1992 ; Meca *et al.*, 2010 ; Zinedine *et al.*, 2011 ; Cuomo *et al.*, 2013 ; Nazari *et al.*, 2016). De plus, la beauvericine est connue pour sa cytotoxicité sur les lymphocytes humains et animaux ainsi que pour entraîner le dysfonctionnement des mitochondries et des érythrocytes. Cependant pour ces deux molécules, l'EFSA a conclu qu'une exposition aigue n'est pas toxique pour l'Homme. Les dangers suite à une exposition chronique n'ont pas été abordés (EFSA, 2011 ; EFSA, 2014).

Les trichotécènes, notamment la toxine T-2 (Figure 5.c) est également connue pour être produite par *F. tricinctum* (Fremy, 2010 ; Aniołowska, Steininger, 2014). Cette toxine est connue pour inhiber la synthèse protéique et altérer les immunoglobulines. L'ANSES préconise une dose journalière de 60 ng/kg/p.c [7].



Figure 6 : *Diaporthe angelicae* souche DA057 cultivé sur milieu PDA, 10 jours : Colonie cotonneuse de couleur blanc-gris. (Bastide et al., 2017)

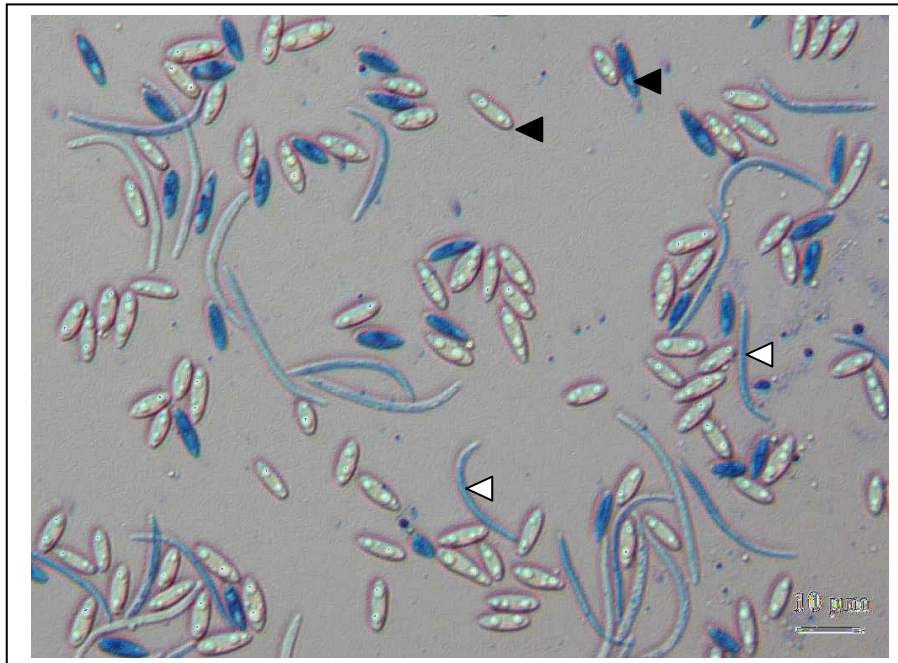


Figure 7 : Observations microscopiques de conidies de *D. angelicae* issues de pycnides sur résidus de culture colorées au bleu de méthyl. Conidies- $\alpha$  (flèche noire) et conidies- $\beta$  (flèche blanche). Microscope Leica DM1000. (Chateau, 2017)

Enfin, la zéaralénone (Figure 5.d), avec son effet mimétique des œstrogènes (liaison aux récepteurs œstrogéniques) est produite par *F. tricinctum* (Caldwell *et al.*, 1970 ; Aniolowska, Steininger, 2014). Elle est connue pour entraîner des troubles de la fertilité et de la reproduction notamment quand elle est présente dans l'alimentation animale. L'ANSES préconise, dans la liste établie par les autorités françaises pour l'analyse des risques dans l'alimentation animale, une dose journalière à ne pas dépasser de 0.20 µg/kg/p.c [8].

D'autres mycotoxines produites par l'espèce *F. tricinctum* sont présentées en Annexe I.

## **II.3 – *Diaporthe angelicae***

### **II.3.1 – Généralités sur le genre *Diaporthe***

Le genre *Diaporthe* est la forme asexuée de champignons Ascomycètes connus sous le nom de *Phomopsis*. On compte dans le genre *Diaporthe* environ 1000 noms d'espèces et autour de 860 noms d'espèces pour le genre *Phomopsis* (Gomes *et al.*, 2013). Les espèces de *Diaporthe* sont connues pour être à l'origine de nombreuses maladies répandues sur une large gamme d'hôtes: pourritures racinaires, pourritures de fruits, chancres, dépérissements, grillures foliaires (Uecker *et al.*, 1988 ; Rossman *et al.*, 2007). Ces pathogènes sont également connues pour être endophytes chez les plantes ligneuses (Rossman *et al.*, 2007).

### **II.3.2 – Description de *Diaporthe angelicae***

L'espèce *D. angelicae* a été décrite par Castlebury *et al.* (2003). Après une semaine de culture sur PDA à l'obscurité à 20°C, un mycélium aérien, blanc/gris pâle sur les bords et gris foncé au centre est visible (Figure 6). Ce champignon peut produire des pycnides (reproduction asexuée) typiques de l'espèce, dans lesquelles sont observées des conidies  $\alpha$  et  $\beta$  (Figure 7). Les conidies  $\alpha$  sont ovoïdes, unicellulaires et mesurent environ 6.5 µm de longueur pour 2.2 µm de largeur. Les conidies  $\beta$  quant à elles sont unicellulaires et peuvent mesurer jusqu'à 24 µm de longueur pour 1 µm de largeur (Cazanove, 2015). Ces pycnides sont également une forme de conservation sur les débris de culture au champ (Bastide *et al.*, 2017). La reproduction sexuée de ce champignon se réalise sous forme de périthèces. Il est possible d'obtenir ces périthèces lorsque les cultures en boîtes sont placées sous lumière noire (Castlebury *et al.*, 2003 ; Bastide *et al.*, 2017). Ce sont des structures globulaires de couleur noire, dans lesquelles sont produits des asques. Chaque asque contient 8 ascospores bicellulaires (Morel *et al.*, 2013).

En complément de ces descriptions morphologiques, les travaux de Castlebury *et al.* (2003) décrivent également les hôtes et la distribution géographique de *D. angelicae*. Les espèces de la famille des *Apiaceae* semblent être des hôtes privilégiés de ce pathogène. Des espèces appartenant aux genres *Angelica*, *Anthriscus*, *Eryngium* ou encore au genre *Daucus*, sont quelques exemples de cette gamme d'hôtes. La répartition de ce pathogène est vaste, en effet sa présence a été relevée aussi bien en Europe, qu'au Canada et aux USA.

### **II.3.3 – Impact sur la carotte porte-graine**

Comme présenté précédemment, *D. angelicae* est l'agent responsable des grillures d'ombelles. Le champignon pénètre dans la plante par la fleur et contamine une involuclle avant d'atteindre l'involucre (Gombert, 2016), formant ensuite une grillure en quartier. La





maladie peut s'étendre ensuite à la plante entière comme en témoignent les plages de nécroses triangulaires descendantes visibles sur les tiges décrites par Von Arx (1951). Ces symptômes empêchent la formation de semences sur les ombelles touchées.

En complément, l'étude des semences réalisée par Cazanove en 2015 a permis de montrer que même si le champignon est détecté sur ces dernières, aucune plantule contaminée n'a été observée après germination de semences infectées. *D. angelicae* ne semble donc pas être transmissible par la semence.

Enfin, la bibliographie ne relate pas la production de mycotoxines par *D. angelicae/Phomopsis dauci*. Il n'est cependant pas exclu qu'une telle production existe. En effet des mycotoxines produites par *Phomopsis foeniculi* ont été décrites sur fenouil (Evidente *et al.*, 2011). La nectriapyrone, l'altersolanol A ou encore la macrosporine, peuvent être citées chez le genre *Phomopsis*, notamment pour leurs potentielles activités antibactériennes ou anticancéreuses (Evidente *et al.*, 2011 ; Mishra *et al.*, 2015).

### **III – Objectifs de l'étude**

#### **III.1 – *Fusarium tricinctum* : analyses phénotypiques, moléculaires et méthodes de lutte**

Pour cette première partie, des plantes symptomatiques ont été récupérées par les partenaires au champ et des isolements des souches pathogènes ont été effectués sur milieux gélosés. Des souches préalablement isolées par les partenaires ont également été utilisées. Une caractérisation phénotypique des souches sera d'abord réalisée : aspect et couleur du mycélium, vitesse de croissance, apparition et caractérisation de la forme asexuée en culture (morphologie des macroconidies et des microconidies) ainsi que la présence de chlamydo-spores seront à relever. Afin de déterminer l'espèce correspondant aux souches collectées, des analyses génotypiques seront également réalisées en utilisant les séquences ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal puis la séquence du gène de la  $\beta$ -tubuline.

Un screening *in vitro* de fongicides et de produits de biocontrôle sera également réalisé afin de déterminer si certains fongicides autorisés en culture de carotte porte-graines sont efficaces contre ce nouveau pathogène et mettre en évidence l'effet des produits de biocontrôle sur ce dernier. Les fongicides seront testés grâce à la méthode de néphélométrie. Les produits utilisés en contrôle biologique, seront quant à eux testés grâce à la méthode de confrontation de souches sur boîtes.

#### **III. 2 – *Diaporthe angelicae* : contaminations artificielles et localisation tissulaire**

Pour cette deuxième partie, il s'agira d'abord de valider le stade de sensibilité maximale au pathogène *Diaporthe angelicae* auparavant démontré par Nicolas Cazanove (2015). Pour réaliser ceci, des ombelles de carottes prélevées au champ à différents stades de floraison



Figure 8 : Echantillon de carottes prélevées dans une parcelle de producteurs de semences (Epiez (41), prélèvements FNAMS) présentant des symptômes de nécrose au collet semblant être dus à *Fusarium* spp. (Chateau, 2017)

seront inoculées artificiellement avec une suspension de conidies. Les symptômes seront ensuite notés et comparés pour déterminer le stade le plus sensible.

Les tiges issues des ombelles contaminées seront ensuite analysées. Des coupes transversales seront réalisées au niveau des plages de symptômes observées sur ces tiges afin de mettre en évidence par l'intermédiaire de différentes techniques de microscopie la localisation tissulaire du pathogène dans son hôte. Les voies de pénétration au sein de ce dernier seront quant à elles étudiées au MEB (Microscopie Electronique à Balayage). Pour cela, des contaminations florales seront réalisées et les pétales et carpelles seront observés.

## **IV – Matériels et méthodes**

### **IV.1 – Origines et entretien des souches de *Fusarium***

Les souches utilisées lors de cette étude ont deux origines. Une partie des souches provient d'isolements effectués par les partenaires du projet, ces souches sont déjà isolées sur milieux gélosés. A la réception, celles-ci sont repiquées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour les multiplier.

Une autre partie des souches provient de carottes récupérées sur le terrain par les partenaires du projet (Figure 8). Après réception, les organes sont lavés une première fois à l'eau courante puis les parties présentant des symptômes sont séparées en petits explants. Ces échantillons sont ensuite placés dans un bain d'eau de javel à 2.4 % pendant 5 min afin de réaliser une désinfection superficielle en détruisant les potentielles bactéries et champignons saprophytes. Deux rinçages de 5 min chacun sont ensuite effectués dans de l'eau milli-Q afin d'enlever l'excès d'eau de javel. Les explants sont ensuite déposés sur milieu PDA avec un bactéricide. Il s'agit de streptomycine à la concentration de 500 mg.L<sup>-1</sup>. Les boîtes d'isolement sont ensuite placées à 20°C à l'obscurité pendant 1 semaine avant d'être repiquées sur milieu PDA classique.

Un repiquage des champignons sur milieu PDA est effectué toutes les 3 semaines afin de toujours avoir des souches disponibles. La liste des différentes souches est présentée dans le Tableau 4.

### **IV.2 – Phénotypage et analyse moléculaire des souches**

Pour le phénotypage, la vitesse de croissance de chaque souche est étudiée. Pour ce faire, les souches sont repiquées sur milieu PDA, au centre d'une boîte de Petri ronde de 96 mm de diamètre. Cinq boîtes de chaque souche sont réalisées. Pour chaque boîte, deux rayons de croissance sont mesurés à 2, 3, 4 et 8 jours. Pour le phénotypage, plusieurs caractéristiques, décrites par Nelson *et al.* (1983), sont étudiées sur des colonies de *Fusarium* repiquées sur milieux PDA et SNA (Synthetischer Nährstoffarmer Agar). Ces caractéristiques sont : l'aspect et la couleur du mycélium sur milieu PDA, la présence de chlamydospores, la répartition et la couleur des sporodochies, ainsi que la morphologie des macroconidies et microconidies. Pour voir ces caractéristiques, un morceau de scotch crystal est posé sur le mycélium puis déposé sur une goutte de bleu de méthyle préalablement

**Tableau 4 : Caractéristiques des souches de *Fusarium* étudiées origine géographique et plante hôte.**

Souches	Partenaires	Date	Provenance	Coordonnées GPS	Hôtes
LBH16-18	Clause	2016	Epiez (41)	ND	Carotte PG Hybride
F72/1	Fredon CLV	2016	Villaugon (G. Baucher) (41)	47.735533 1.476985	Carotte PG
PAS 48	GEVES	~1990	ANSES	ND	Semences de blé
PAS 50	GEVES	~1990	ANSES	ND	Semences de blé
763304	GEVES	2017	ND	ND	Oignon
D1487	Vilmorin	14/04/2016	Mer (G. Baucher) (41)	ND	Carotte PG Hybride
FS1	FNAMS	10/03/2017	Epiez (41)	47.703553 1.403937	Carotte PG Hybride
FS2	FNAMS	10/03/2017	Mer (G. Baucher) (41)	47.731154 1.489930	Carotte PG Hybride
FS3	FNAMS	10/03/2017	Villesecron (D. Dupuis) (41)	47.653100 1.358625	Carotte PG Hybride
FS4	FNAMS	10/03/2017	Mer (EARL La Brûlée) (41)	47.691974 1.474881	Carotte PG Hybride
FS5	FNAMS	13/03/2017	Epieds en Beauce (45)	47.932512 1.595761	Carotte PG Hybride
FS6	FNAMS	4/04/2017	Villaugon (41)	47.734220 1.470897	Carotte PG Hybride
FS7	FNAMS	4/04/2017	Villesecron (D. Dupuis) (41)	47.653100 1.358625	Carotte PG Hybride
FS8	FNAMS	10/04/2017	Mer (G. Baucher) (41)	47.731154 1.489930	Carotte PG Hybride
FS9	FNAMS	11/04/2017	Epiez (41)	47.703553 1.403937	Carotte PG Hybride

ND = Non déterminé

disposée sur une lame. Les observations et photographies sont réalisées au microscope LEICA DM1000.

Pour les analyses moléculaires, l'extraction d'ADN est réalisée selon un protocole d'extraction d'ADN au micro-ondes (Goodwin et Lee, 1993) (Annexe II). Une amplification de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr est ensuite réalisée par PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant les amorces universelles ITS1 et ITS4 (White, 1990). Le milieu réactionnel pour la PCR (25µL) est composé de : 1µL d'ADN fongique dilué 10 fois, 0.5 U de GoTaq Polymerase (Promega), 1.4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de chaque amorce, 0.2 mM de dNTPs, 5,0 µL de tampon de réaction et d'eau ultra pure stérile (Bastide *et al.*, 2017). Les paramètres du thermocycleur (Bio Rad T1000™ Thermal Cycler) sont présentés dans le tableau suivant :

Température	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	15 °C
Temps	3 min	30 s	30 s	1 min	5 min	∞

X 35 cycles

Une fois la PCR terminée, les échantillons sont déposés sur gel d'agarose à 1.2% dans du tampon TAE x 0.5 (20 mM Tris-Acétate pH 8.0, 0.5 mM EDTA) et mis à migrer à 220 V pendant 20 minutes. Pour la révélation, les gels sont disposés dans un bain de BET (10 mg.L<sup>-1</sup>) pendant 25 minutes avant d'être révélés aux radiations UV. Les produits d'amplification sont ensuite purifiés et séquencés par l'entreprise GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). Pour déterminer l'espèce de *Fusarium* correspondant à chaque souche, un alignement des séquences obtenues est réalisé sur le site du NCBI (<https://l.c.cx/cXoy>) en utilisant la fonction BLAST.

La séquence du gène codant pour la β-tubuline a également été utilisée comme second marqueur moléculaire pour détecter plus précisément l'espèce de *Fusarium*. Pour ce gène, les séquences de plusieurs espèces de *Fusarium* susceptibles d'être confondues avec *Fusarium tricinctum* ont été alignées avec le logiciel MultAlin [9] pour définir des amorces pouvant discriminer l'espèce *F. tricinctum* d'autres espèces de *Fusarium* : FusaBtub-F1 (5'-GAAGTCGGAAGCAGCCATCAT-3') et FusaBtub-R1 (5'- TTCAGACCGGTTCAGTGCCTAA-3'). Les amplifications par PCR pour ces amorces et l'analyse par BLAST ont été réalisées comme décrit précédemment pour les amorces universelles.

### IV.3 – Lutte contre *F. tricinctum* : screening *in vitro* de fongicides par néphélométrie et tests de confrontation sur boîtes

#### IV.3.1 – Sporulation des souches de *F. tricinctum*

La néphélométrie est une technique qui permet à l'origine de mesurer la turbidité d'un milieu. Au laboratoire de l'équipe FungiSem, elle a été adaptée pour mesurer la germination de conidies et la croissance du mycélium dans différentes conditions (Joubert *et al.*, 2010).

Cette technique nécessite des conidies, la sporulation des souches est donc nécessaire. La capacité à sporuler de *Fusarium tricinctum* étant peu décrite dans la bibliographie, différents milieux de sporulation ont été testés :

- Milieu SNA : Ce milieu pauvre favorise la sporulation des *Fusarium* en général. Il favoriserait également la sporulation de *F. tricinctum* (Champion, 1997) (Annexe III). Des membranes sont disposées dans les boîtes comme présenté sur la (Figure 9.a).

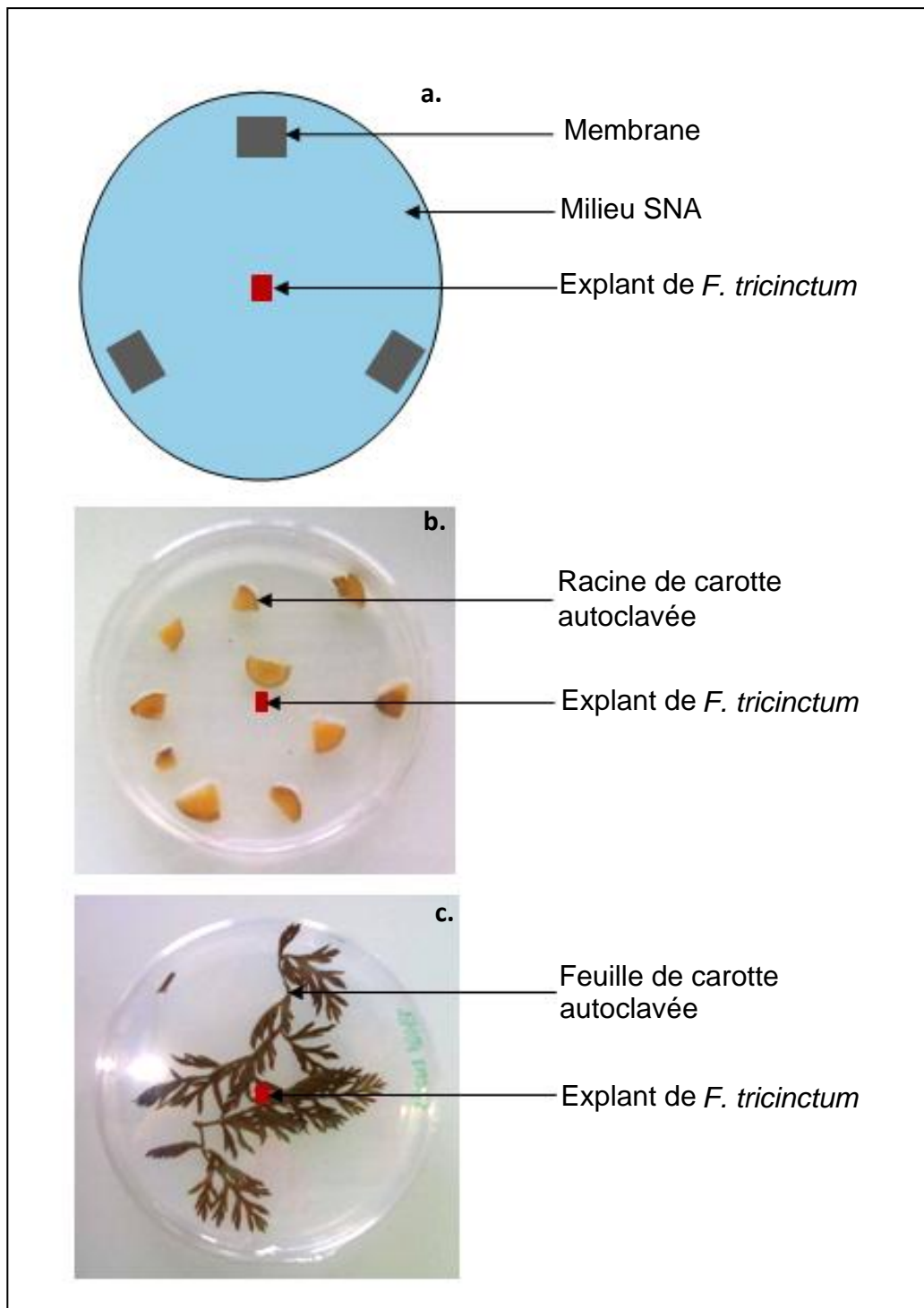


Figure 9 : Dispositif expérimental utilisé pour l'obtention de conidies de *Fusarium tricinctum* sur différents milieux. a : milieu SNA avec membrane. b : Milieu SNA avec racines de carotte. c : Milieu SNA avec feuilles de carotte. (Chateau, 2017)

Ces membranes permettent d'accentuer le stress hydrique et nutritif perçu par le champignon et de favoriser sa sporulation.

- Milieu SM (Supplemented Medium) + Asparagine : Lynch *et al.* (1985) rapportent que ce milieu favoriserait la sporulation de *F. tricinctum*. Il s'agit d'un milieu pauvre de composition proche du milieu SNA, auquel de l'asparagine est ajoutée (Annexe IV).
- Milieu SNA + racines de carottes ou SNA + feuilles de carottes (Figure 9.b et c) : Les tronçons de racines de carottes ou les feuilles de carottes permettraient de créer des « îlots » de sucres pour compenser la pauvreté du milieu SNA et ainsi favoriser le développement et la sporulation de *F. tricinctum*.

Pour chaque milieu testé, la moitié des boîtes est placée à l'obscurité à 20°C jusqu'à la sporulation, l'autre moitié est placée à la lumière noire (0.5 W.m<sup>-2</sup>; Coaxel, L18/73) avec une photopériode de 12 h par jour. La sporulation de ces souches est généralement obtenue après deux à trois semaines de culture.

#### IV.3.2 – Néphélométrie

La souche D1487, isolée en 2016 et déterminée comme étant de l'espèce *F. tricinctum* par Vilmorin, est utilisée comme souche de référence. La souche FS3 est également utilisée ici. Ces souches ont été choisies car elles sporulent abondamment sur milieu SNA + racines de carotte. Pour préparer la suspension de conidies, 1 mL d'eau stérile ultra pure est placé dans un tube Ependorff. Les sporodochies sont prélevées et déposées dans le tube à l'aide d'un scalpel. Un comptage sur une cellule de Thoma est ensuite réalisé pour connaître la concentration en conidies. Les mélanges pour la néphélométrie sont ensuite réalisés, à raison d'un tube par produit testé. Les matières actives utilisées sont l'azoxystrobine (Amistar®; Syngenta), le fluopyram et la trifloxystrobine (Luna® Sensation; Bayer CropScience), la fluoxastrobine et le prothioconazole (Fandango®; Bayer CropScience) et le thiophanate-méthyl (Topsin® 70WG; Certis). Un fongicide à base d'extraits d'Alliciées, le Veg`Lys® (Phytoauxilium), sera également testé. Les caractéristiques des produits, leurs modes d'action et les concentrations utilisées sont présentés en Annexe V.

- Pour les fongicides sans strobilurines et pour le Veg`Lys®, le mélange se compose de 890 µL de PDB, de 100 µL de suspension de conidies à 10<sup>6</sup> macroconidies.mL<sup>-1</sup> et de 10 µL de fongicide concentré 100 fois ou de Veg`Lys® concentré 100 fois par rapport à la concentration réelle appliquée au champ.

- Pour les fongicides contenant une strobilurine, le mélange se compose de 890 µL de milieu PDB/SHAM (acide salicylhydroxamique) à 28 mg.L<sup>-1</sup>, de 100 µL de suspension de conidies à 10<sup>6</sup> macroconidies.mL<sup>-1</sup> et de 10 µL de fongicide concentré 100 fois par rapport à la concentration réelle appliquée au champ. En effet, les strobilurines inhibent le site d'oxydation de l'ubiquinol (Qo) du cytochrome bc1 de la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du complexe III. Or les champignons possèdent une voie de respiration alternative. En effet, lorsque la voie respiratoire classique est inhibée, les électrons sont transférés à une alternative oxidase (AOX). L'ajout de SHAM permet donc d'inhiber cette voie de respiration alternative et d'observer les effets primaires des strobilurines sur la germination des conidies et sur la croissance mycélienne.

- Les tubes témoins positifs sont composés de 900 µL de milieu PDB ou de milieu PDB/SHAM à 28 mg.L<sup>-1</sup> additionnés de 100 µL de la suspension de conidies à 10<sup>6</sup>





macroconidies.mL<sup>-1</sup> et les tubes témoins négatifs contiennent seulement le milieu PDB ou le milieu PDB/SHAM

Les préparations précédemment réalisées sont laissées en contact 4 heures (temps estimé de germination des conidies et temps de contact entre les fongicides et les pathogènes fongiques estimé au champ). Une série de dilutions est ensuite réalisée pour obtenir une concentration finale de 10<sup>3</sup> conidies/mL. Une plaque 96 puits est ensuite remplie avec les échantillons. Trois puits contenant chacun 300 µL sont réalisés pour chaque modalité. Le néphélomètre est ensuite mis en route pour 200 cycles de 10 min, soit 33 heures. Chaque cycle correspond à une mesure de croissance mycélienne. Deux répétitions sont réalisées. A l'issue de la néphélométrie, une matrice reportant les différentes mesures sous formes d'aires sous la courbe est obtenue. Ces données permettent d'accéder aux aires moyennes sous la courbe et au pourcentage d'inhibition par rapport aux témoins pour chaque répétition.

#### IV.3.3 – Confrontations de *Fusarium tricinctum* avec les produits de biocontrôle

Trois souches de *Fusarium tricinctum* (D1487, LBH1618 et FS3) sont mises en confrontation avec trois souches de *Trichoderma*. Deux sont des souches commerciales : I1237 *T. atroviride* (Esquive®WG, Agrauxine) et T22 *T. harzianum* (Trianum-P®, Koppert). Une souche provient du laboratoire MMS de Nantes et est utilisée dans le projet NABUCO (Guillemette et Bastide, communication personnelle) : 1295 *T. atroviride*. Les confrontations d'une souche de *Fusarium* avec une souche de *Trichoderma* sont réalisées sur milieu PDA dans des boîtes carrées (120 x 120 mm). Pour chaque modalité, trois boîtes sont repiquées. Les explants de *Fusarium* sont déposés dans l'un des coins de la boîte. Vingt-quatre heures après, les explants de *Trichoderma* sont à leur tour déposés dans le coin de la boîte opposé à *Fusarium*. Des mesures de croissance sont réalisées 2, 6, 9 et 11 jours après mise en culture des explants de *Trichoderma*. Les pourcentages d'inhibition (PI) des colonies de *Fusarium* sont calculés grâce à la formule suivante :

$$PI (\%) = \left( 1 - \frac{\text{Taille colonie } Fusarium \text{ en confrontation}}{\text{Taille colonie } Fusarium \text{ témoin}} \right) \times 100$$

Une date de début de confrontation est également relevée. Sept jours après cette date, une note de parasitisme est attribuée sur une échelle de -1 à 4 selon le recouvrement des colonies de *Fusarium* par le mycélium de *Trichoderma*. Une note de -1 correspond à un recouvrement de la colonie de *Trichoderma* par celle de *F. tricinctum* compris entre 5% et 25%. Une note de 4 correspond à un recouvrement de plus de 75% de la colonie de *F. tricinctum* par celle de *Trichoderma*. Deux répétitions sont faites.

### IV.4 – Stade de sensibilité des porte-graines à *Diaporthe angelicae* et localisation tissulaire du champignon.

#### IV.4.1 – Entretien et sporulation de la souche DA057

La souche de *Diaporthe angelicae* DA057, décrite par Bastide et al. (2017), est mise en culture sur du milieu Malt-Agar fourni par la SNES. La souche est repiquée et disposée à l'obscurité à 20°C pendant 7 jours. Après 7 jours de culture, les boîtes sont transférées sous lumière noire (0.5 W.m<sup>-2</sup>; Coaxel, L18/73) à 20°C avec une photopériode de 12 h par jour pendant environ 20 jours, jusqu'à l'obtention de pycnides.

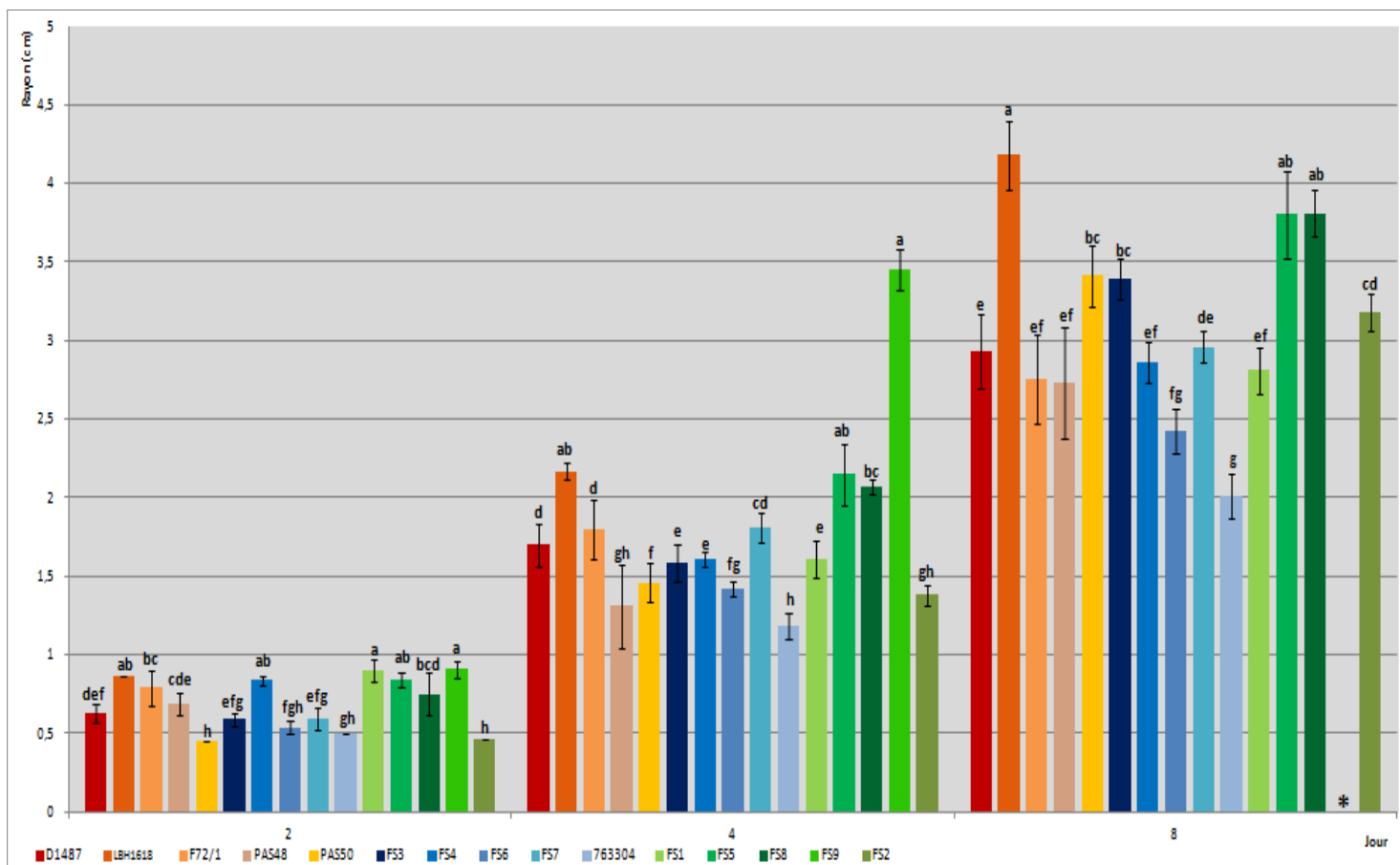


Figure 10 : Croissance des différentes souches de *Fusarium* de l'étude pour les jours 2, 4 et 8 après mise en culture sur milieu PDA. Les souches de D1487 (rouge) à PAS50 (jaune) et 763304 (lavande) sont les souches préalablement isolées fournies par les partenaires. Les souches de FS3 (indigo) à FS2 (kaki) sont les souches issues de prélèvements réalisés en 2017. Les lettres correspondent aux groupes statistiques issus du test de Kruskal Wallis à 5%.

Tableau 5 : Identification des espèces de *Fusarium* : matrice simplifiée des caractéristiques macroscopiques et microscopiques

Souches	Présence et couleur des sporodochies	Forme des macroconidies	Forme des microconidies	Identification de l'espèce
D1487	Orange	Croissant	Citron – Poire	<i>F. tricinctum</i>
FS1	Orange	Faucille	-	<i>F. avenaceum</i>
FS2	blanches	Bâton	Grain de riz	NI
FS3	Orange	Croissant	Citron – Poire	<i>F. tricinctum</i>
FS4	Orange	Croissant	-	NI
FS5	-	-	Grain de riz	NI
FS6	-	-	Citron – Poire	NI
FS7	Orange	Croissant	Citron – Poire	<i>F. tricinctum</i>
FS8	-	-	Grain de riz	NI
FS9	-	Croissant	-	<i>F. tricinctum</i>
PAS48	-	-	Citron – Poire	NI
PAS50	-	-	Citron – Poire	NI
F72/1	Orange	Croissant	Citron – Poire	<i>F. tricinctum</i>
763304	Orange	Faucille	-	<i>F. avenaceum</i>
LBH1618	Orange	Croissant	Citron - Poire	<i>F. tricinctum</i>

Légende : NI : non identifié ; - : non visible.

#### IV.4.2 – Préparation de la suspension de conidies et contaminations artificielles

Une solution d'inoculation composée d'eau milliQ, de 5% en volume de glycérol et de 1% en volume de Tween 20 est utilisée. Pour réaliser la suspension, des cirrhes contenant les conidies, prélevées au scalpel sur les pycnides, sont déposées dans un tube Ependorff contenant 1mL de la solution d'inoculation. Un comptage est ensuite réalisé à l'aide d'une cellule de Thoma pour obtenir la concentration en conidies  $\alpha$  par mL de milieu. A partir de ce tube, 50 mL de suspension à  $10^6$  conidies.mL<sup>-1</sup> est réalisée.

Des ombelles de carotte (variété Nantaise) sont prélevées dans une parcelle expérimentale à Brain-sur-l'Authion (FNAMS) à différents stades phénologiques (S0, S1, S2 et S3). Ces ombelles ont été conservées dans du sable de Fontainebleau sous conditions contrôlée à 25°C : Lumière/Obscurité 12 h/12 h et 80% d'humidité relative.

L'inoculum est appliqué par aspersion de la suspension de conides sur les ombelles jusqu'à ruissellement. Les symptômes sont suivis 2 à 3 fois par semaine pendant 21 jours. Pour les ombelles présentant des symptômes, une note est attribuée selon l'échelle décrite par Bastide et al. (2017).

#### IV.4.3 – Réalisation des coupes et observations microscopiques

Pour la détermination des voies de pénétration de *Diaporthe angelicae* au niveau de l'ombelle, les observations sont réalisées au microscope électronique à balayage de table Phenom (Plateau IMAC). Pour cela, des ombelles de stade S2 sont utilisées 48 heures après inoculation réalisée selon les conditions décrites au dessus. Les fleurs des ombelles sont récupérées à l'aide d'un scalpel et collées sur un support, qui est ensuite placé dans la chambre optique pour observation.

Concernant l'observation du champignon au sein des tissus, les ombelles symptomatiques issues des contaminations sont récoltées après notation des symptômes et utilisées pour effectuer les observations microscopiques au niveau de la tige. Des coupes transversales sont réalisées avec un Cryostat Leica (Plateau IMAC). Pour cela, des tronçons de tiges de 0.5 cm sont découpés à la frontière des symptômes. Les échantillons sont ensuite placés dans une solution à 0.1% de solophényl dans l'eau à l'obscurité 10 min (coloration des parois mycéliennes ; Hoch et al., 2005)). Deux rinçages successifs de 3 min sont réalisés à l'eau distillée. Les tronçons sont alors séchés sur papier buvard, collés sur un support, puis enrobés de colle. Le tout est placé dans la chambre de congélation à - 39°C. A partir des échantillons, des coupes de 14  $\mu$ m sont obtenues. Les observations ont été réalisées au SCIAM au microscope confocal (TCS SP8, LEICA), et sur le plateau IMAC au microscope Olympus à épifluorescence et au microscope Leica DM4500 B à épifluorescence de FungiSem.

## V – Résultats

### V.1 – Phénotypage et génotypage des isolats de *Fusarium* : caractérisation

#### des souches

Pour la vitesse de croissance des souches, les résultats sont présentés pour les jours 2, 4 et 8 dans la Figure 10. La souche de référence fournie par Vilmorin, D1487, est représentée en rouge. La normalité des résidus ainsi que l'égalité des variances des données n'étant pas

**Tableau 6 : Résultats du séquençage des régions ITS et du gène de la  $\beta$ -tubuline : espèces identifiées, n° d'accèsion et pourcentages de similarité des séquences**

Séquençage ITS					Séquençage $\beta$ -tubuline			
Souches	Noms	N° d'accèsion	E-value	% similarité	Noms	N° d'accèsion	E-value	% similarité
<b>FS1</b>	<i>F. avenaceum</i>	KX276604.1	9 <sup>e</sup> -160	100%	<i>F. avenaceum</i>	KY055840.1	0.0	99%
<b>FS2</b>	<i>F. redolens</i>	KU901534.1	0.0	99%	<i>F. redolens</i>	KP964925.1	0.0	99%
<b>FS3</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KP641142.1/ KX067809.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	EU490236.1	0.0	99%
<b>FS4</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. avenaceum</i>	MF372578.1/ KU057819.1	0.0	100%	<i>F. tricinctum</i>	EU490236.1	0.0	99%
<b>FS5</b>	<i>F. avenaceum</i>	KU529152.1	0.0	100%	<i>F. avenaceum</i>	KY055840.1	0.0	99%
<b>FS6</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. avenaceum</i>	MF372578.1/ KU057819.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	EU490236.1	0.0	99%
<b>FS7</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. avenaceum</i>	MF372578.1/ KU057819.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	EU490236.1	0.0	99%
<b>FS8</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. avenaceum</i>	HM037940.1/ JX402183.1	0.0	99%	<i>F. avenaceum</i>	KY055840.1	0.0	99%
<b>FS9</b>	<i>F. culmorum</i>	LT598662.1	0.0	99%	<i>F. culmorum</i>	LT598662.1	0.0	99%
<b>PAS48</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KP641142.1/ KX067809.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	KU852605.1	0.0	99%
<b>PAS50</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KP641142.1/ KX067809.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	KU852605.1	0.0	99%
<b>D1487</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KP641142.1/ KX067809.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	EU490236.1	0.0	99%
<b>LBH1618</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KP641142.1/ KX067809.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	KU852605.1	0.0	99%
<b>F72/1</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KP641142.1/ KX067809.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i>	EU490236.1	0.0	99%
<b>763304</b>	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KP641142.1/ KX067809.1	0.0	99%	<i>F. tricinctum</i> / <i>F. acuminatum</i>	KJ396329.1/ EU490236.1	0.0	99%

respectées, un test de Kruskal Wallis à 5% a été réalisé. Le test de Kruskal Wallis pour la croissance du mycélium sur milieu PDA montre qu'il y a bien un effet souche (p-Value = 0.017 pour le jour 2, p-Value = 0.012 pour le jour 4 et p-Value = 0.015 pour le jour 8). Néanmoins, graphiquement une grande hétérogénéité de croissance mycélienne est visible, il est difficile de déterminer un groupe homogène avec la souche de référence D1487. Il est important de relever que la souche FS9 aurait une croissance mycélienne plus rapide que les autres souches. En effet, au jour 4, le rayon atteint 3.5 cm tandis que celui des autres souches ne dépasse pas 2.5 cm. Pour le jour 8, le rayon de cette souche n'a pu être mesuré, la limite de la boîte de Pétri étant atteinte.

En complément, des observations sur différentes caractéristiques des souches sur milieux PDA et milieux SNA ont été réalisées afin de mettre en avant des différences permettant de les identifier, D1487 étant toujours la souche de référence. Pour ce phénotypage, une des caractéristiques primordiales est la sporulation des souches. Les souches cultivées sur le milieu SNA complété de tronçons de racines ou de feuilles de carotte sont plus aptes à la sporulation après 7 jours de culture à l'obscurité à 20°C suivis de 2 à 3 semaines à la lumière noire à 20°C comparativement au milieu SNA seul et au milieu SM + asparagine. Il est important de noter que la souche FS1 quant à elle sporule entre 5 et 7 jours à l'obscurité à 20°C, sans passage à la lumière noire. La matrice complète de phénotypage est présentée en annexe VI. Un tableau simplifié (Tableau 5) issu de la matrice de phénotypage ainsi que la clé de détermination des principales espèces de *Fusarium* (Thrane, 1991), ont permis de déterminer l'espèce à laquelle appartiendraient certaines des souches. Sur 15 souches y compris la souche de référence, cinq présentent des sporodochies orange dans lesquelles se trouvent des macroconidies pluriseptées en forme de croissant et des microconidies piriformes et citriformes. Ces souches, à savoir D1487, FS3, FS7, F72/1 et LBH1618, ont été déterminées comme étant de l'espèce *Fusarium tricinctum*. Deux souches (FS1 et 763304), présentant également des sporodochies orange contenant des macroconidies en forme de faucille, ont été classées dans l'espèce *Fusarium avenaceum*. Les autres souches n'ont pas pu être identifiées au niveau de l'espèce par manque de données ou de description dans la clé de détermination.

Une analyse moléculaire complémentaire a été réalisée par amplification et séquençage de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr, grâce aux séquences universelles ITS1-ITS4. Ces analyses ont permis de déterminer avec précision l'espèce pour seulement trois souches de *Fusarium*. L'analyse des séquences amplifiées de FS1 (310 pb) et FS5 (500 pb), dans la base de données du NCBI, montre 100 % de similarité avec deux séquences de *F. avenaceum* (n° accession KX276604.1 et KU529152.1). Pour FS2 (436 pb), une similarité de 99% est obtenue avec une séquence de *F. redolens* (n° accession KU901534.1). Pour aller plus loin, le gène de la  $\beta$ -tubuline des différentes souches a été amplifié avec les amorces Fusa $\beta$ tub-F1 et Fusa $\beta$ tub-R1. L'analyse des séquences amplifiées de D1487, FS3, FS4, FS6, FS7 et F72/1 montre une similarité de 99% avec une séquence de *F. tricinctum* (n° accession EU490236.1). L'analyse par BLAST des séquences amplifiées de PAS48, PAS50 et LBH1618 montre une similarité de 99% avec la séquence de *F. tricinctum* (n° accession KU852605.1). L'analyse des séquences de FS8 et FS9 montrent respectivement 99% de similarité avec des séquences de *F. avenaceum* (n° accession KY055840.1) et *F. culmorum* (n° accession LT598662.1). Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

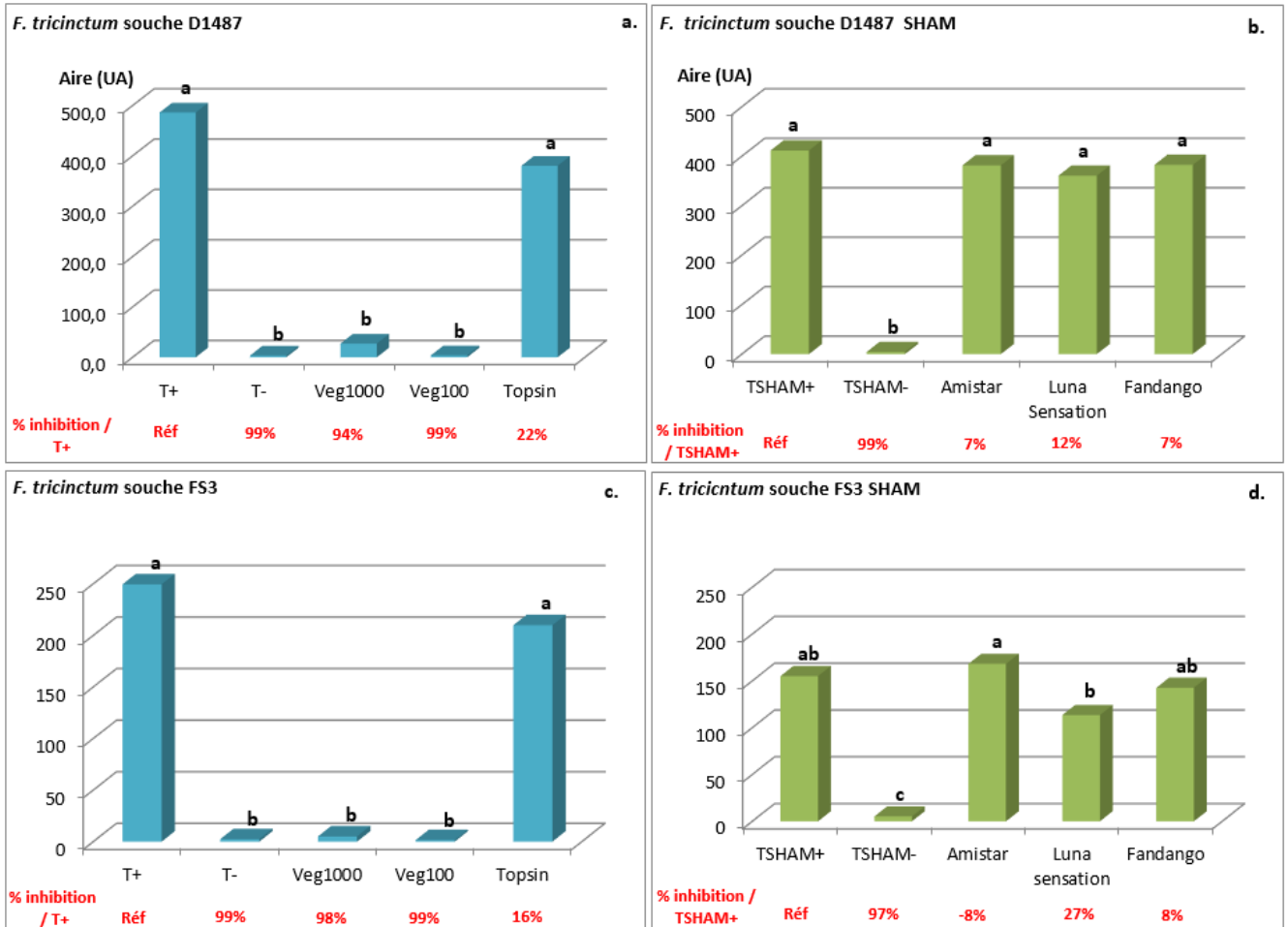


Figure 11: Croissance de deux souches de *F. tricinctum* étudiées par néphélométrie. Les résultats représentent les aires sous la courbe de croissance et le pourcentage d'inhibition par les fongicides ; a : souche D1487 en absence de SHAM, b : souche D1487 en présence de SHAM, c : souche FS3 en absence de SHAM, d : souche FS3 en présence de SHAM. Les lettres correspondent aux groupes issus du test de Kruskal-Wallis à 5%.

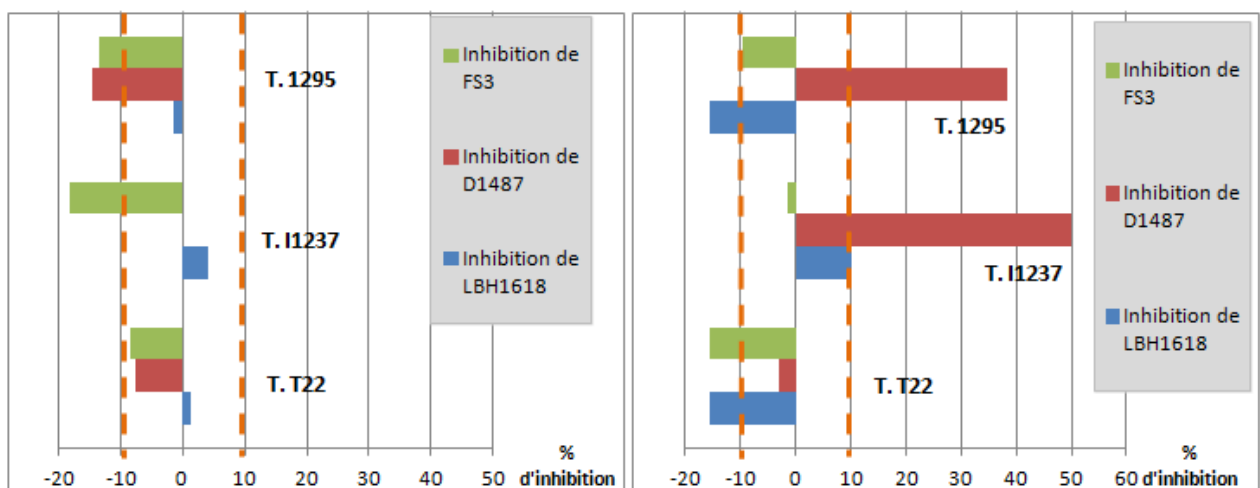


Figure 12 : Relevé de l'effet antibiose exprimé sous forme de % au jour 2 pour les souches de *F. tricinctum* FS3, D1487 et LBH1618 en confrontation avec les souches de *Trichoderma* 1295, I1237 et T22 sur milieu PDA. Histogramme à gauche : répétition 1. Histogramme à droite : répétition 2. Entre -10% et 10% (barres orange), on considère qu'il n'y pas d'effet notable d'antibiose.

## V.2 – Screening *in vitro* des fongicides et produits de biocontrôle pour lutter contre

### *Fusarium tricinctum*

Les résultats du screening *in vitro* de fongicides pour D1487 et FS3 sont présentés dans la Figure 11. Les valeurs de référence sont le témoin positif avec les conidies et sans fongicides (T+) et le témoin positif avec SHAM sans fongicides (T+SHAM) lorsqu'il y a des strobilurines dans les produits testés. La normalité des résidus ainsi que l'égalité des variances des données n'étant pas respectées, un test de Kruskal Wallis à 5% a été réalisé.

Pour D1487, en absence de SHAM (Figure 11.a), deux groupes statistiquement différents se distinguent. En effet, le premier groupe formé des conditions T+/ Topsin®, a une aire moyenne sous la courbe située entre 350 UA et 500 UA. Tandis que le deuxième groupe, formé des conditions témoin négatif (T-), Veg1000 et Veg100 a une aire moyenne sous la courbe inférieure à 50 UA. Pour FS3 (Figure 11.c), les mêmes groupes sont visibles. Cependant dans ce cas, l'aire moyenne sous la courbe se situe aux alentours de 200 UA pour le groupe T+/Topsin® et aux alentours de 5 UA pour le groupe T-/Veg1000/Veg100.

Pour D1487 en présence de SHAM (Figure 11.b), deux groupes statistiquement différents se distinguent également. Avec une aire moyenne sous la courbe entre 300 UA et 400 UA, le groupe TSHAM+/Amistar®/Luna sensation®/Fandango® est statistiquement différent du groupe formé par la condition TSHAM-, dont l'aire moyenne est de 4 UA.

Pour FS3 en présence de SHAM (Figure 11.d), même si plus de variabilité entre les différents fongicides existent, on repère néanmoins deux groupes statistiquement différents. D'une part le groupe TSHAM+/Amistar®/Luna sensation®/Fandango®, avec une aire moyenne située entre 100 UA et 170 UA, et d'autre part le groupe formé de la condition TSHAM-, ayant une aire moyenne aux alentours de 5 UA.

Les pourcentages d'inhibition par rapport aux témoins (Figure 11), permettent d'illustrer ces différences. En effet que ce soit pour les souches D1487 ou FS3 en condition sans SHAM (Figure 11.a et c), le VEG`LYS® dilué au 100<sup>ème</sup> et au 1000<sup>ème</sup> permet d'inhiber la germination des conidies jusqu'à 99%, ce qui est comparable au témoin en absence de conidies (T-). Le Topsin® quant à lui, aurait un effet moindre, en inhibant très peu cette germination, d'où la différence non significative avec le témoin sans fongicide (T+). Pour la souche D1487 en présence de SHAM, les faibles pourcentages d'inhibition témoignent de la faible efficacité des fongicides au stade de germination des conidies de cette souche. Pour la souche FS3, les résultats sont semblables, aucune différence statistique avec le témoin sans fongicides n'a été relevée. Ces produits ne sont donc pas non plus efficaces contre la germination des conidies de la souche FS3.

Les *Trichoderma*, agents de biocontrôle, ont été testés vis-à-vis des souches D1487, LBH1618 et FS3 de *F. tricinctum*. Dans un premier temps, un travail sur l'antibiose a été réalisé. Des pourcentages d'inhibition des *Fusarium* par les *Trichoderma* ont été calculés. Par convention, les pourcentages d'inhibition compris entre -10% et 10% sont considérés comme sans effet notable. Comme cela est visible dans la Figure 12, les valeurs obtenues pour les deux répétitions effectuées dans les mêmes conditions sont très différentes. L'exemple le plus frappant est pour la souche D1487. En effet lors de la répétition 1, aucune inhibition de la souche D1487 n'est visible (les pourcentages sont inférieurs à 10%), une stimulation de la croissance de cette souche par le *Trichoderma* T22



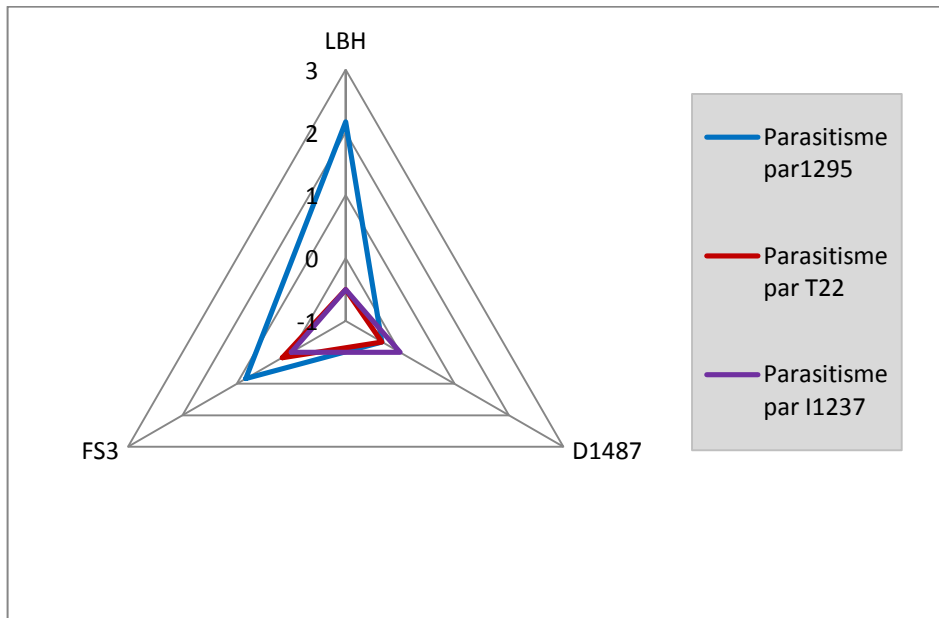


Figure 13: Note de parasitisme des souches de *F. tricinctum* D1487, FS3 et LBH1618 par *T. artroviride* 1295 et I1237 et par *T. harzianum* T22. Les notes vont de -1 à 4 : -1 correspond au parasitisme d'une souche de *Trichoderma* par une souche de *Fusarium*, et 4 à un parasitisme d'une souche de *Fusarium* par une souche de *Trichoderma* supérieur à 75%.

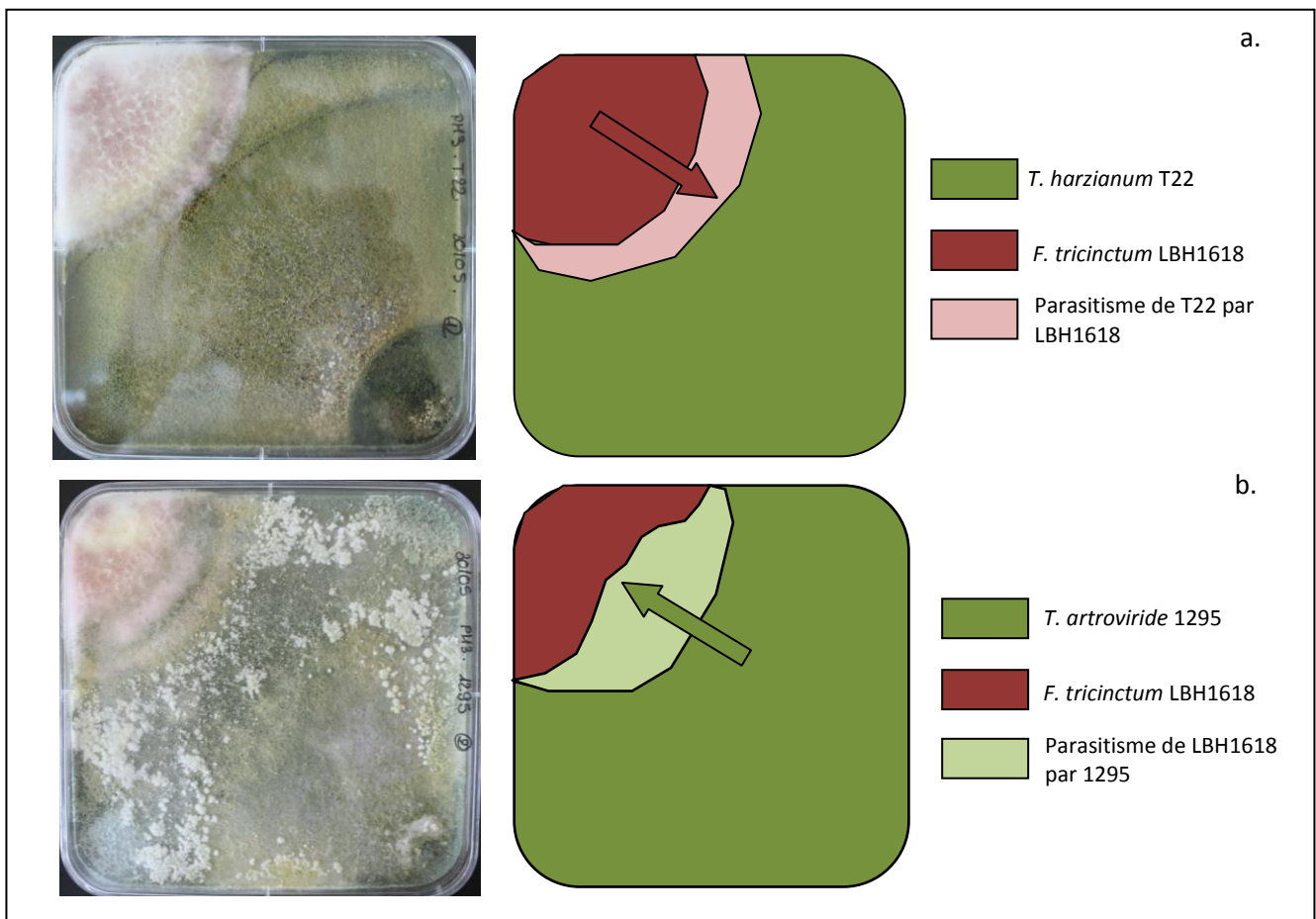


Figure 14 : Exemples de parasitisme 7 jours après le début de la confrontation entre une souche de *Fusarium* et une souche de *Trichoderma*. a : Parasitisme de la souche T22 par la souche LBH1618. b : Parasitisme de la souche LBH1618 par la souche 1295.

est même observée (-14,5%). Ces constats s'opposent à ce qui est obtenu pour la répétition 2 pour laquelle la souche de *Trichoderma* I1237 inhiberait la croissance de la souche D1487 à hauteur de 50% et la souche T22 à hauteur de 38,5%.

Pour la suite, les notes de parasitisme ont été utilisées. La moyenne des 6 notes de parasitisme a été calculée pour chaque souche de *F. tricinctum* en confrontation avec chaque souche de *Trichoderma*. Les résultats du parasitisme sont présentés dans la Figure 13. De manière générale, les souches T22 et I1237 ne parasitent que très peu les 3 souches de *F. tricinctum* testées ici. Les notes de parasitisme varient entre -0.5 et 0.5, ce qui représente un recouvrement inférieur à 5% de *F. tricinctum* par les *Trichoderma*, voire dans certains cas un parasitisme des *Trichoderma* par *F. tricinctum* (Figure 14.a).

La souche 1295 (*T. atroviride*) serait, quant à elle, plus agressive, notamment avec la souche LBH1618 pour laquelle la note de parasitisme est de 2.2, ce qui correspond à un recouvrement mycélien de LBH1618 par 1295 entre 25% et 50% (Figure 14.b). Pour les deux autres souches de *Fusarium*, la souche 1295 est néanmoins peu agressive (note de parasitisme inférieure à 1).

### V.3 – Stade de sensibilité maximale de la carotte porte-graine à *Diaporthe*

#### *angelicae*

L'obtention de la forme asexuée (pyncnides) de *Diaporthe angelicae* en conditions contrôlées s'est avérée compliquée cette année suite à un problème technique (invasion d'acariens). Afin de pallier ce problème, des résidus de cultures provenant d'un essai conduit en 2016 sur *Phomopsis dauci* ont été prélevés sur une parcelle expérimentale située à la FNAMS à Brain-sur-l'Authion (49). Les résidus présentant des pyncnides ont été mis en culture dans une chambre climatique (22°C 8 h jour et 19°C 16 h nuit) pendant 2 jours avant les contaminations artificielles. Les cirrhes émises par les pyncnides ont été récupérées pour la préparation de la suspension de spores. Suite à l'inoculation, la notation des symptômes et l'observation des stades de sensibilité n'a pas été possible pour cette expérience. En effet, la présence d'un mycélium blanc gris a été observée sur les ombelles. De même, les tiges ont été colonisées par ce mycélium qui ne semble pas appartenir à l'espèce *D. angelicae*. La base des tiges semble être le point d'entrée de cet organisme fongique. Il est important de noter, que des pyncnides correspondant à la forme asexuée de *Diaporthe* ainsi que des sporodochies orange semblant appartenir au genre *Fusarium* ont été relevées à la base de la tige. Des analyses moléculaires (séquençage du gène de la  $\beta$ -tubuline) ont montré qu'il s'agit de *Fusarium avenaceum*. Pour *Diaporthe*, les analyses restent à effectuer.

### V.4 – Voies de pénétration du champignon dans l'hôte et localisation tissulaire de

#### *D. angelicae*

Les observations au MEB ont permis de mettre en évidence que *D. angelicae* pénètre dans son hôte, ici *Daucus carota*, par l'intermédiaire des carpelles. En effet, après germination de la conidie, le mycélium produit pénètre dans la plante au niveau des ostioles situés à la base des styles. Ce phénomène est visible sur la Figure 15.

A partir de la coupe de tige de carotte observée au microscope confocal (Figure 16), les différents tissus ont été identifiés. En association avec ces observations, la microscopie à épifluorescence réalisée ensuite a permis de mettre en évidence que le pathogène serait

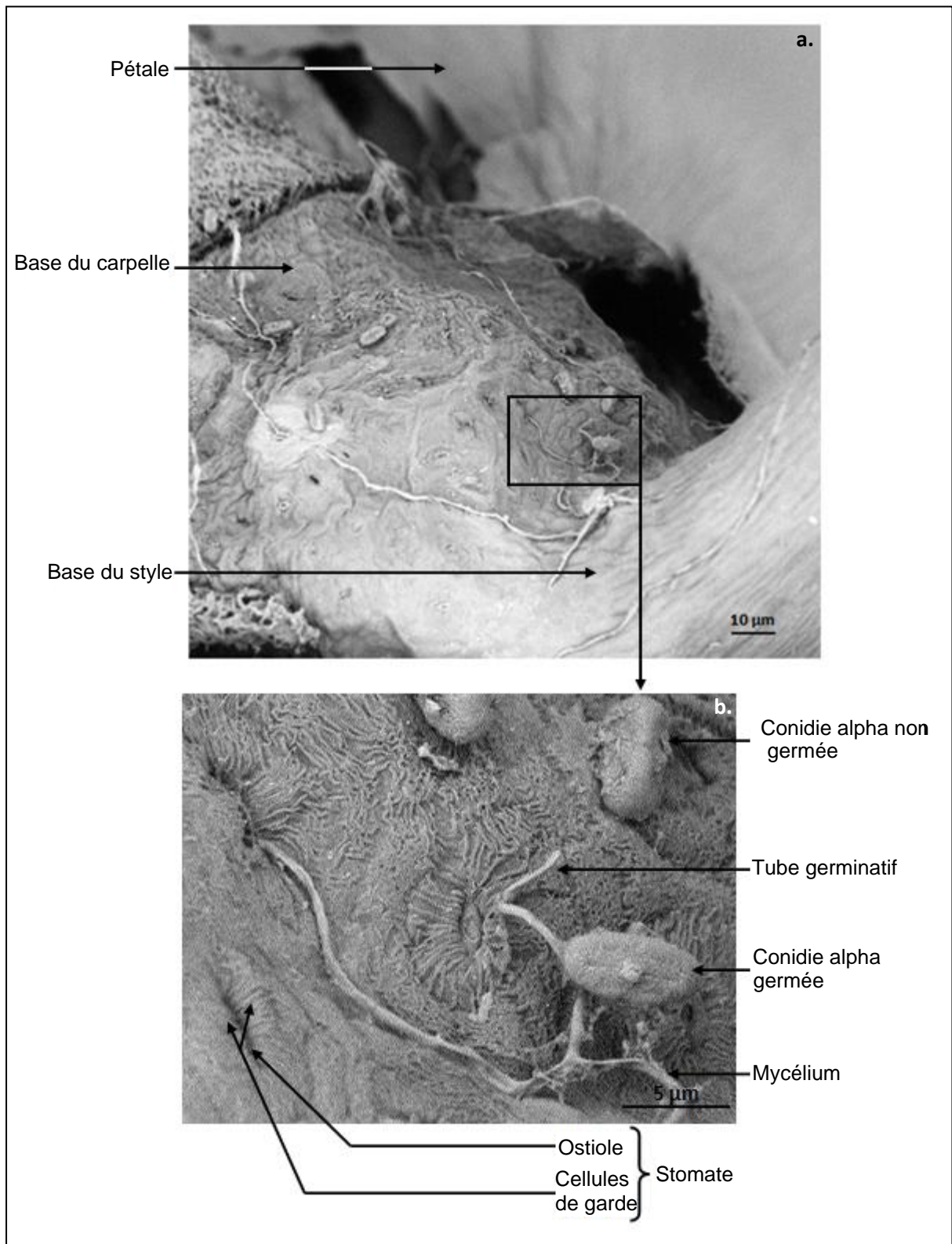


Figure 15 : a : pénétration du mycélium de *D. angelicae* dans la carotte par l'intermédiaire des stomates sur le carpelle, à la base du style. b : détail de la pénétration du mycélium dans l'hôte par les stomates.

présent dans les vaisseaux conducteurs. Dans notre cas, il s'agit d'une présence dans les faisceaux de xylème (Figure 17 a. et b.). Le mycélium pourrait également coloniser d'autres tissus, notamment le parenchyme cortical ou encore les cellules bordant les canaux sécréteurs de la tige, comme cela est visible en Figure 17 c. et d.

## VI – Discussion

Pour *Fusarium tricinctum*, l'étude de la croissance mycélienne des différentes souches de *Fusarium* n'est pas un caractère discriminant de l'espèce pour différencier les souches étudiées. En effet, même si un effet souche important existe pour la croissance, une grande hétérogénéité interspécifique et intraspécifique semble exister. Un phénotypage plus poussé a donc été nécessaire.

C'est dans ce but que les caractéristiques macroscopiques (aspect et couleur du mycélium sur milieu PDA, répartition et couleur des sporodochies) et microscopiques (présence de chlamydospores, morphologie des macroconidies et microconidies), décrites par Nelson *et al.* (1983), ont été étudiées. Grâce à la matrice de phénotypage obtenue, aux descriptions de Nelson *et al.* (1983) ainsi qu'à la clé 'Fuskey' (Thrane, 1991), les espèces de certaines souches de l'étude ont pu être déterminées. Cependant, le phénotypage est un outil de détermination pouvant se révéler non fiable. C'est le cas pour l'aspect des macroconidies, qui est l'une des caractéristiques clé dans la détermination des *Fusarium*. En effet, les macroconidies immatures, ayant une forme différente, peuvent fausser le diagnostic. De plus, certaines souches n'ont pas produit ces macroconidies *in vitro*, malgré les différents milieux de sporulation testés, ce qui rend alors la détermination impossible. Il est cependant important de noter que pour la plupart des *Fusarium* mis en culture, les milieux SNA supplémentés de morceaux de racines ou de feuilles de carotte sont plus aptes à faire sporuler les souches. Le milieu SNA permettrait en effet de mimer l'effet d'un stress nutritif qui serait alors compensé par les sources de carbone mises dans le milieu mimant la présence de l'hôte et permettant au champignon de fructifier.

Une analyse moléculaire complémentaire a été réalisée par amplification de la région ITS1-5.8S-ITS2 de l'ADNr grâce aux amorces universelles ITS1 et ITS4 (White, 1990). Ces analyses ont permis de déterminer l'espèce avec précision pour deux souches de *Fusarium avenaceum* (FS1 et FS5) et une souche de *Fusarium redolens* (FS2). Néanmoins, les analyses par séquençage des régions ITS ne se montrent pas toujours assez discriminantes. En effet, pour les autres souches, il y a confusion entre *Fusarium tricinctum* et *Fusarium acuminatum*. En complément, l'amplification du gène de la  $\beta$ -tubuline a été réalisée, en accord avec les travaux de Li *et al.* (2013), avec des amorces spécifiques de l'espèce *Fusarium tricinctum*, définies lors du stage. Cette amplification s'est révélée quant à elle suffisamment précise pour lever la confusion entre *F. tricinctum*, *F. acuminatum* et *F. avenaceum* pour six souches, sauf pour la souche 763304 déterminée comme *F. tricinctum* ou *F. acuminatum*.

Parmi les 15 souches de *Fusarium* à disposition dans cette étude, 9 se révèlent être de l'espèce *Fusarium tricinctum*. Deux de ces souches sont issues de prélèvements à Villaugon (41) en 2016 et en 2017. Ce pathogène était donc présent deux années consécutives dans des parcelles situées dans le 41. Ces deux souches pourraient s'avérer être similaires. Pour s'en assurer, il faudrait réaliser des analyses complémentaires par exemple en utilisant les



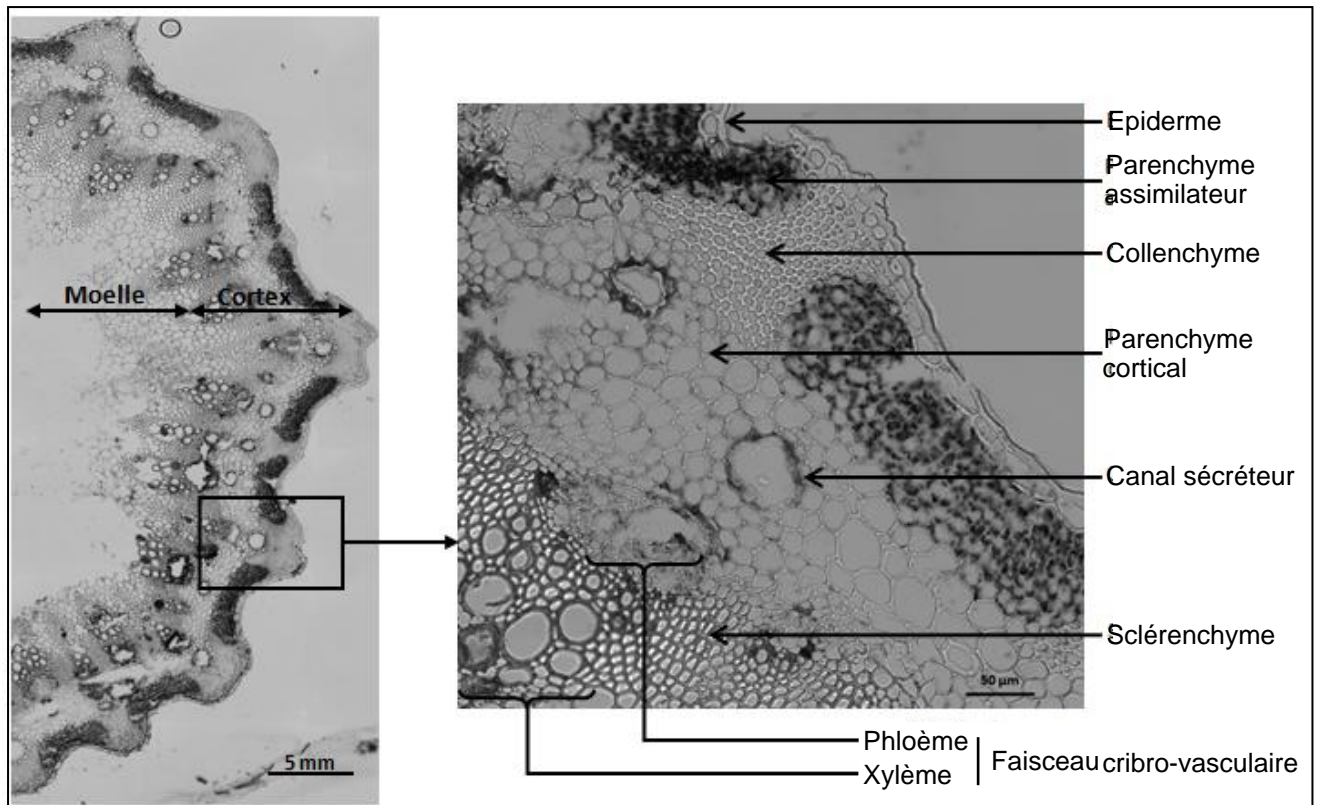


Figure 16 : Coupe transversale de tige de fleur de carotte observée au microscope confocal. (SCIAM)

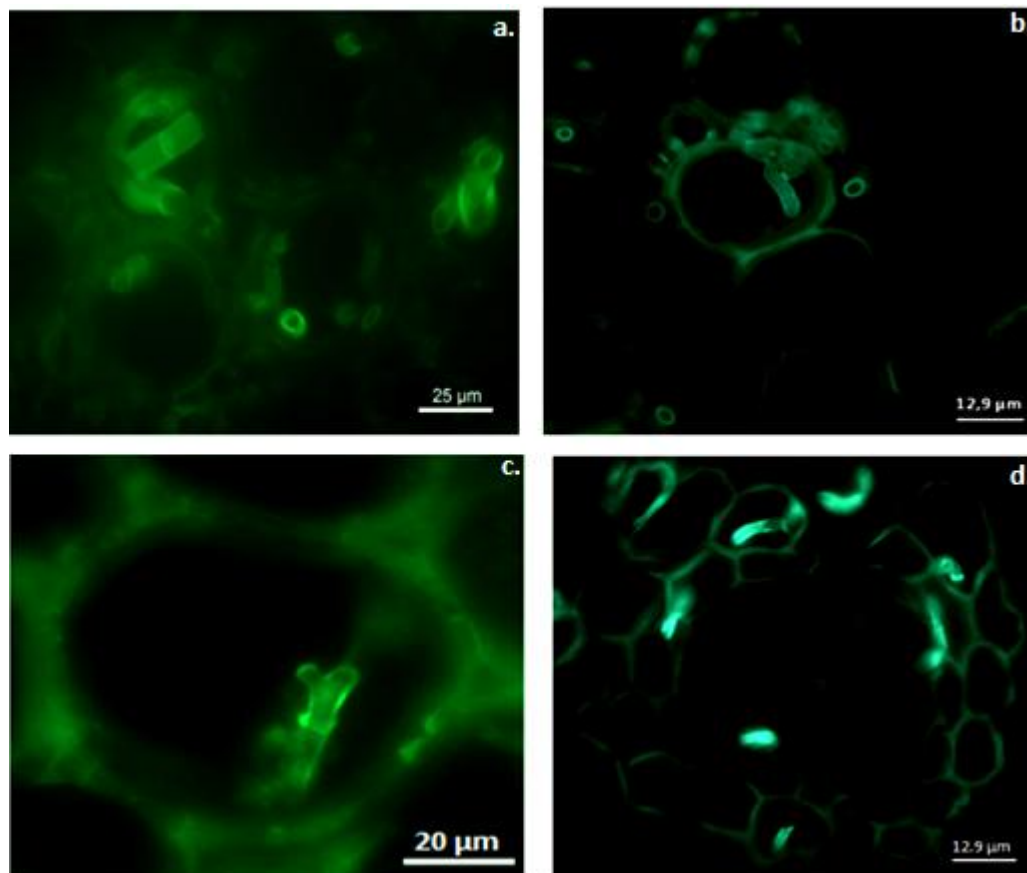


Figure 17 : Observation de coupes transversales de tiges de carotte (section de 14µm) en microscopie à épifluorescence (plateau IMAC). Coloration au solophényl. a et b : Mycélium de *D. angelicae* présent dans les vaisseaux de xylème ; c: Mycélium de *D. angelicae* présent dans le parenchyme cortical ; d : Mycélium présent dans les cellules aux abords d'un canal sécréteur).

séquences IGS (InterGenic Spacer) (Hyun-Jung *et al.*, 2001). En effet, ce niveau d'analyse permettrait de mettre en évidence les différences intra spécifiques, et ainsi de déterminer si ces deux souches sont effectivement les mêmes. D'après notre étude, l'hypothèse selon laquelle *F. tricinctum* serait un organisme conservé dans le sol est fortement probable. Pour aller plus loin dans l'étude de ce pathogène, des inoculations sur carotte en conditions contrôlées puis des ré-isolements devraient être réalisés afin de valider l'intégralité du postulat de Koch. Il faudrait pour cela optimiser la méthode de sporulation, notamment pour les souches n'ayant pas ou peu produit de macroconidies lors de cette étude et mettre au point une méthode d'inoculation artificielle.

Trois souches ont été déterminées comme étant de l'espèce *Fusarium avenaceum*. Même si cette espèce est particulièrement décrite en tant que pathogène sur céréales, elle est cosmopolite et posséderait une gamme d'hôtes très diversifiée (Booth, 1971). Une souche de *Fusarium culmorum* a également été déterminée. Il s'agit d'un pathogène des céréales au même titre que *Fusarium avenaceum* (Golinski *et al.*, 2002), et est connu pour être responsable de la pourriture racinaire de la carotte [10]. Enfin, une souche a été déterminée comme appartenant à l'espèce *Fusarium redolens*. Il s'agit d'un champignon endophyte décrit comme pathogène sur une gamme d'hôtes assez diverse comme les céréales (John et Brett, 2008), l'oignon en Finlande (Haapalainen *et al.*, 2016), le pois chiche en Tunisie (Bouhadida *et al.*, 2017) ou encore le ginseng en Chine (Guan *et al.*, 2013).

Le phénotypage et/ou le séquençage ont permis de déterminer l'espèce correspondant à chacune des souches présentes dans le panel de départ. La suite de l'étude a consisté à tester la sensibilité des souches de *F. tricinctum* à différents fongicides utilisables en culture de carottes porte-graines. Pour le screening *in vitro* par néphélométrie, la souche de référence D1487 (Vilmorin, 2016) ainsi que la souche FS3 (isolée lors de la présente étude) ont été utilisées. Différents fongicides ont également été testés, dont certains contenaient une molécule de la famille des strobilurines. Les fongicides de cette famille sont additionnés d'acide salicylhydroxamique (SHAM). Comme expliqué dans la partie matériels et méthodes, les strobilurines agissent en inhibant la chaîne respiratoire mitochondriale au niveau du complexe III. Une Alternative Oxydase (AOX) peut alors prendre le relais et permettre la poursuite de la synthèse d'ATP et la diminution de la production de ROS (Reactive Oxygen Species) (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Le SHAM permet d'inhiber cette voie alternative et donc d'observer les effets primaires des strobilurines sur la germination des conidies et la croissance mycélienne au laboratoire.

Les tests de néphélométrie ont permis de montrer que les doses de fongicides, préconisées sur le site E-Phy (<https://ephy.anses.fr/>) pour les cultures de carottes porte-graines, seraient très peu efficaces contre *F. tricinctum*. Néanmoins une seule dose a été testée pour chacun des fongicides, il pourrait donc être intéressant de réaliser d'autres tests de néphélométrie avec cette fois ci une gamme de concentrations pour déterminer l'existence d'un seuil d'efficacité des fongicides selon les souches de *Fusarium* testées. Le VEG`LYS® serait quant à lui efficace. En effet, ce produit serait capable d'inhiber la germination de l'ensemble des conidies présentes dans les puits. Des valeurs d'inhibition, comparables aux témoins sans les conidies (94% à 99%) sont d'ailleurs observées pour ce produit. Il s'agit d'extraits d'huiles végétales d'oignon et d'ail. Les composés qui auraient cette activité antifongique seraient des composés contenant des groupes sulfures tels le propyl propane thiosulfinate (PTS) et le propyl propane thiosulfonate (PTS-O). Le Veg`Lys® a montré un effet antifongique puissant *in vitro*, il serait maintenant important de confirmer ces résultats en



réalisant des tests incluant d'autres souches de *Fusarium tricinctum* afin de voir si elles présentent toutes une sensibilité semblable à ce produit puis de faire des essais au champ. Ces essais pourraient être réalisés sur plante, afin non seulement d'évaluer l'efficacité du fongicide contre *F. tricinctum* et de voir s'il n'impacte pas le développement de la plante. Ces tests au champ sont primordiaux pour vérifier si les conditions environnementales permettraient également d'observer l'efficacité du Veg`Lys®.

Trois souches de *Trichoderma* potentiellement utilisables comme agents de biocontrôle ont été testées vis-à-vis du pathogène *F. tricinctum* sur milieu PDA. Les conditions d'expérimentation entre les deux répétitions effectuées étant similaires, les différences d'inhibitions relevées pour l'effet antibiose pourraient être expliquées par la variabilité d'action des agents de biocontrôle à différents niveaux. Il pourrait s'agir d'une variabilité de production des VOCs (Volatil Organic Coumpounds) ou d'une variabilité de production de composés antibiotiques diffusés dans la gélose. La présence ou l'absence de ces composés ainsi que leur quantité conditionneraient alors la réponse de croissance des *Fusarium* selon les répétitions.

En revanche, le parasitisme semble être un critère pertinent pour déterminer l'éventuelle efficacité des *Trichoderma* contre les différentes souches de *Fusarium tricinctum*. Il est intéressant de noter que les souches commerciales, *Trichoderma atroviride* I1237 et *Trichoderma harzianum* T22, seraient en réalité peu efficaces comme agents de lutte contre *F. tricinctum*. Ce dernier irait même jusqu'à parasiter les souches de biocontrôle dans certaines situations. La souche de *T. atroviride* 1295 issue du laboratoire MMS de Nantes serait capable de parasiter *F. tricinctum*, dans le cas de la souche LBH1618. Il ressort néanmoins que des expériences complémentaires avec la souche 1295 et un panel de souches de *F. tricinctum* plus large devraient être menées pour explorer la capacité de cette souche 1295 à parasiter l'espèce *F. tricinctum* et sa potentielle utilisation comme agent de biocontrôle. Afin d'augmenter la puissance de l'essai permettant l'étude du parasitisme, il faudrait notamment augmenter le nombre de données, en utilisant des boîtes de Pétri rondes (96 mm) afin d'observer plus rapidement le parasitisme.

Par ailleurs, des tests de confrontation avec d'autres agents de biocontrôle ont été réalisés (résultats non présentés). Il s'agit de produits commerciaux fournis par la FNAMS afin d'évaluer leur efficacité contre *F. tricinctum*. Ces produits sont : Amylo X® composé de *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *Plantarum* (souche D747), BF 501 BCS® composé de *Bacillus subtilis* (souche QST 713) et Rhizovital® composé de spores de *Bacillus amyloliquefaciens* (souche FZB42). Ces souches bactériennes seraient connues pour synthétiser des polycétides et des lipopeptides ayant un fort pouvoir inhibiteur de la croissance de *F. graminearum* (Chen *et al.*, 2008, 2009). Une caractérisation des antibiotiques par HPLC, couplée à une analyse ESI/MS a permis de mettre en évidence que ces lipopetides antibiotiques appartiennent à la famille des surfactines, des iturines et des fengycines (Chen *et al.*, 2008, 2009). Un premier essai a été mené sur boîtes carrées (120 x 120 mm) avec d'un côté les explants de *F. tricinctum* et de l'autre une suspension de *Bacillus*. Cette expérience avait pour objectif de favoriser la diffusion des antibiotiques cités ci-dessus et leur diffusion dans la gélose pour inhiber la croissance de *F. tricinctum*. Cette expérience n'ayant pas été probante, d'autres essais ont été réalisés, notamment avec un dépôt de suspension bactérienne autour d'explants de *Fusarium* pour apprécier l'effet des *Bacillus* en tant qu'agents inhibiteurs de croissance. De plus, pour mimer les effets d'une application de produits de biocontrôle au champ, une autre méthode de confrontation





pourrait être testée, notamment par aspersion du produit sur le mycélium de cultures *in vitro* de *F. tricinctum*.

Pour *Diaporthe angelicae*, il a été précédemment montré que le stade S2 (chute des étamines et ouverture complète de la fleur) est le plus sensible (Cazanove, 2015 ; Gombert, 2016). La validation de ces résultats n'a pas été possible cette année. En effet, les expériences de contaminations artificielles n'ont pas abouti, car un autre pathogène (*Fusarium avenaceum*) s'est développé sur les boutures d'ombelles. Il est probable que cette souche de *Fusarium* ait été préalablement présente au champ dans les cultures, et que les conditions de température et d'humidité combinées à l'ajout de sucres (contenus dans la solution d'inoculation) lui aient permis de se développer et de coloniser les plantes. Une autre hypothèse plausible serait que lors de la préparation de l'inoculum avec les cirrhes issues des résidus de culture, des conidies de *Fusarium avenaceum* aient été prélevées et inoculées sur les boutures d'ombelles. Néanmoins, lors des comptages sur cellules de Thoma, seules des conidies  $\alpha$  et  $\beta$  de *D. angelicae* ont été observées, la première hypothèse serait donc à privilégier. L'absence de symptômes dus à *D. angelicae* pourrait quant à elle, être expliquée par la croissance très rapide et compétitive de *F. avenaceum* qui aurait empêché le développement de *D. angelicae*. Les observations au MEB ont néanmoins révélé que *D. angelicae* était bien présent après inoculation des ombelles et qu'il y a même eu pénétration et contamination au niveau du gynécée de l'hôte. Il a déjà été démontré que la fleur et plus précisément les stigmates, sont le point d'entrée du champignon (Gombert *et al.*, 2016). Les nouvelles observations au MEB effectuées lors de la présente étude, ont révélé que les stomates à la base des styles, constituent également une autre voie d'entrée pour le pathogène jusqu'ici inconnue. Ainsi, plusieurs voies de pénétration existent. En revanche, la pénétration par les pétales n'a pas pu être observée dans notre étude (résultats non présentés). Par ailleurs, les pycnides observées à la base des boutures d'ombelles confirment que le champignon *D. angelicae* était bien présent malgré le développement de *F. avenaceum*.

Les études histologiques réalisées par microscopie confirment l'hypothèse selon laquelle le champignon colonise la plante par l'intermédiaire des tissus conducteurs. Dans le cas présent, les faisceaux du xylème pourraient permettre un transport ascendant du champignon, de la base de la tige vers les ombelles. Des plages de nécroses typiques le long de la tige tendent à confirmer ce point. Du mycélium a également été observé dans d'autres tissus de la plante, notamment les parenchymes. La contamination via le xylème permettrait donc au champignon de circuler dans la plante mais aussi de coloniser différents tissus de la tige.

Une circulation par le phloème serait envisageable compte-tenu des symptômes observés au champ (nécroses sur tiges à partir des ombelles). Pour mettre cela en évidence, de nouvelles expériences de contaminations artificielles de boutures d'ombelles pourraient être envisagées.

## VII - Conclusion et perspectives

Le premier objectif du stage, était de caractériser un nouveau pathogène des cultures de carottes porte-graine, *Fusarium tricinctum*, tant au niveau morphologique qu'au niveau moléculaire. Il s'agissait également de déterminer via un screening *in vitro*, les fongicides et



les produits de biocontrôle efficaces contre ce champignon. Une première étape a consisté à récupérer différentes souches de ce pathogène, par l'intermédiaire des partenaires grâce à des prospections en parcelles de production. En tout, 15 souches de *Fusarium* ont été récupérées. Des analyses de phénotypage sur des caractéristiques macroscopiques et microscopiques ainsi que des analyses moléculaires (séquençage des régions ITS) ont permis de déterminer précisément l'espèce pour deux souches de *Fusarium avenaceum* et une souche de *Fusarium redolens*. Cependant, l'analyse la plus discriminante et donc à privilégier pour déterminer les espèces de *Fusarium*, est l'analyse par séquençage du gène de la  $\beta$ -tubuline. Avec ces différentes techniques, 9 souches sur les 15 ont été déterminées comme appartenant à l'espèce *Fusarium tricinctum*. Il est important de noter que des souches de ce pathogène ont été récoltées sur les parcelles de carottes porte-graines deux années consécutives, il pourrait donc s'agir d'un pathogène émergent devenant préoccupant pour cette culture. Des expériences complémentaires de contaminations sur plantes et ré-isolement pourraient être menées afin de valider l'intégralité du postulat de Koch. Par ailleurs, le screening *in vitro* de fongicides a permis de mettre en évidence la faible efficacité des matières actives suivantes vis-à-vis de deux souches de *F. tricinctum* : l'azoxystrobine (Amistar® ; Syngenta), le fluopyram et la trifloxystrobine (Luna® Sensation ; Bayer CropScience), la fluoxastrobine et prothioconazole (Fandango® ; Bayer CropScience) et le thiophanate-méthyl (Topsin® 70WG). Néanmoins une des substances testées serait très efficace. Il s'agit du Veg`Lys®, de la marque Phytoauxilium, composé d'extraits d'*Allium cepa* (l'oignon) et d'*Allium sativum* (l'ail). En effet qu'il soit dilué 100 ou 1000 fois, ce produit permet l'inhibition de 99% de la germination et de la croissance des conidies de *F. tricinctum*. Des tests de néphélométrie réalisés avec d'autres souches de *F. tricinctum* permettraient de valider ou non cette efficacité *in vitro* du Veg`Lys®, mise en évidence dans la présente étude. Des tests au champ permettraient quant à eux d'évaluer cette efficacité en conditions réelles de culture.

Par ailleurs, les produits de biocontrôle commerciaux, à savoir ceux composés de *Trichoderma artoviride* (I1237) et de *Trichoderma harzianum* (T22) seraient en réalité peu efficaces contre *Fusarium tricinctum* qui semble elle, très agressive. La souche du laboratoire MMS de Nantes, *Trichoderma artoviride* (1295) serait plus efficace malgré une variation d'efficacité observée sur les trois souches étudiées. Une étude menée sur l'intégralité des souches de *F. tricinctum* du panel pourrait compléter ces observations. Il est donc nécessaire de chercher d'autres agents de biocontrôle efficaces contre ce champignon. C'est pourquoi des expériences avec des produits à base de *Bacillus* ont été initiées.

Le deuxième objectif de cette étude portait sur le pathogène *Diaporthe angelicae*. Il s'agissait dans cette partie de valider les résultats obtenus en 2015 pour le stade de sensibilité maximale du porte-graine à ce pathogène. Cependant, pour cause de problème technique, l'inoculum a été obtenu en mettant à sporuler, en conditions contrôlées, des résidus de culture provenant d'un essai de 2016 sur *Phomopsis dauci* (FNAMS). De plus, un autre champignon que *D. angelicae* s'est développé sur les ombelles utilisées pour la contamination artificielle. Il est fort probable que ce champignon, identifié comme *F. avenaceum*, ait été présent au champ sur les ombelles sous forme de conidies et que les conditions de l'expérience se seraient révélées favorables à la croissance de ce même champignon. Une nouvelle expérience de contamination artificielle devrait être menée afin de confirmer que le stade S2 est bien le stade de sensibilité maximale. Néanmoins à partir de ces ombelles contaminées, une nouvelle voie de pénétration de *D. angelicae* a été mise



en évidence grâce au MEB. Cette voie serait les stomates situés à la base des styles. De plus des coupes de tiges infectées par *D. angelicae* et colorées au solophényl ont permis de mettre en évidence, par l'intermédiaire de la microscopie à épifluorescence, que le champignon se situe dans les vaisseaux conducteurs du xylème ainsi que dans les cellules parenchymateuses. Une localisation dans le phloème n'est pas à exclure cependant, mais reste à démontrer.

## Bibliographie

- ANIOŁOWSKA, M. et STEININGER, M., 2014. Determination of trichothecenes and zearalenone in different corn (*Zea mays*) cultivars for human consumption in Poland. In : *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 33, n° 1, p. 14-19.
- BASTIDE, F., SÉRAN DAT, I., GOMBERT, J., LAURENT, E., MOREL, E., KOLOPP, J., GUILLERMIN, P. L., HAMON, B., SIMONEAU, P., BERRUYER, R. et POUPARD, P., 2017. Characterization of fungal pathogens (*Diaporthe angelicae* and *D. eres*) responsible for umbel browning and stem necrosis on carrot in France. In : *Plant Pathology*. Vol. 66, n° 2, p. 239-253.
- BOEHNKE, B., KARLOVSKY, K., PFOHL, A., GAMLIEL, Y., I. et HW., DEHNE, 2015. Identification of different *Fusarium* spp. in *Allium* spp. in Germany. In : *Communications in agricultural and applied biological sciences*. Vol. 80, n° 3, p. 453-463.
- BOOTH, C., et COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE, 1971. The genus *Fusarium* [en ligne]. S.I. : Farnham Royal, England : Commonwealth Agricultural Bureaux [for the] Commonwealth Mycological Institute. [Consulté le 17 juillet 2017]. Disponible à l'adresse : <http://trove.nla.gov.au/version/27039116>.
- BOUHADIDA, M., JENDOUBI, W., GARGOURI, S., BEJI, M., KHARRAT, M. et CHEN, W., 2017. First Report of *Fusarium redolens* Causing *Fusarium* Yellowing and Wilt of Chickpea in Tunisia. In : *Plant Disease*. Vol. 101, n° 6, p. 1038-1038.
- BRUNETON, J., 2008. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants (2e ed. - retirage broch)*. S.I. : Lavoisier.
- CALDWELL, R.W., TUI TE, J., STOB, M. et BALDWIN, R., 1970. Zearalenone Production by *Fusarium* Species 1. In : *Applied Microbiology*. Vol. 20, n° 1, p. 31-34.
- CARETTE, B. et JOLLIN, S., 1992. La carotte porte-graine semée en place. In : *Bulletin des Semences, Hors-série*.p. 1-32.
- CARRIERI, R., RAIMO, F., PENTANGELO, A. et LAHOZ, E., 2013. *Fusarium proliferatum* and *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. In : *Crop Protection*. Vol. 43, p. 31-37.
- CASTLEBURY, L.A., FARR, D.F., ROSSMAN, A.Y. et JAKLITSCH, W., 2003. *Diaporthe angelicae*, a modern description and placement of *Diaportheopsis* in *Diaporthe*. In : *Mycoscience*. Vol. 44, n° 3, p. 203-208.
- CAZANOVE, N., 2015. Contrôle d'une maladie émergente sur carotte porte graine : *Diaporthe angelicae*. Mémoire de fin d'étude. 29 p.
- CHAMPION, R., 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. S.I. : Editions Quae.
- CHEN, H., WANG, L., SU, C.x., GONG, G.h., WANG, P. et YU, Z.I., 2008. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. In : *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 47, n° 3, p. 180-186.
- CHEN, X. H., KOU MOUTSI, A., SCHOLZ, R., SCHNEIDER, K., VATER, J., SÜSSMUTH, R., PIEL, J. et BORRISS, R., 2009. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. In : *Journal of Biotechnology*. Vol. 140, n° 1, p. 27-37.
- COLLIN, F., et BRUN, L. (2005). Produire des semences de Carotte dans un itinéraire Agrobiologique.
- CONG, L. L., LI, M. N., SUN, Y., CONG, L. L., YANG, Q. C., LONG, R. C., KANG, J. M. et ZHANG, T. J., 2016. First Report of Ro ot Rot Disease Caused by *Fusarium tricinctum* on Alfalfa in North China. In : *Plant Disease*. Vol. 100, n° 7, p. 1503.
- CUOMO, V., RANDAZZO, A., MECA, G., MORETTI, A., CASCONI, A., ERIKSSON, O., NOVELLINO, E. et RITIENI, A., 2013. Production of enniatins A, A1, B, B1, B4, J1 by *Fusarium tricinctum* in solid corn culture: Structural analysis and effects on mitochondrial respiration. In : *Food Chemistry*. Vol. 140, n° 4, p. 784 793.
- EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN, 2011. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food: Zearalenone in food. In : *EFSA Journal*. Vol. 9, n° 6, p. 2197.
- EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM), 2014. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed: Beauvericin and enniatins in food and feed. In : *EFSA Journal*. Vol. 12, n° 8, p. 3802.
- EL-GHOLL, N. E., MCRITCHIE, J. J., SCHOULTIES, C. L. et RIDINGS, W. H., 1978. The identification, induction of perithecia, and pathogenicity of *Gibberella (Fusarium) tricincta* n.sp. In : *Canadian Journal of Botany*. Vol. 56, n° 18, p. 2203-2206.
- EVIDENTE, A., RODEVA, R., ANDOLFI, A., STOYANOVA, Z., PERRONE, C. et MOTTA, A., 2011. Phytotoxic polyketides produced by *Phomopsis foeniculi*, a strain isolated from diseased Bulgarian fennel. In : *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 130, n° 2, p. 173-182.
- FREMY, J.M., 2010. Mycotoxines dans les céréales- Évaluation des risques. In : *Procédés chimie - bio - agro | Agroalimentaire*. p. 18.
- GAUMY, J. L., BAILLY, J. D., BURGAT, V. et GUERRE, P., 2001. Zearalenone: propriétés et toxicité expérimentale. In : *Revue de médecine vétérinaire*. Vol. 152, n° 3, p. 217-234.
- GAUTHIER, A., 2016. Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé [en ligne]. Docteur en pharmacie. Université de Bordeaux : U.F.R des sciences pharmaceutiques. [Consulté le 8 mars 2017]. Disponible à l'adresse : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01315198/document>. HAL : dumas-01315198
- GOLINSKI, P., KACZMAREK, Z., KIECANA, I., WISNIEWSKA, H., KAPTUR, P., KOSTECKI, M. et CHELKOWSKI, J., 2002. *Fusarium* Head Blight of Common Polish Winter Wheat Cultivars – Comparison of Effects of *Fusarium avenaceum* and *Fusarium culmorum* on Yield Components. In : *Journal of Phytopathology*. Vol. 150, n° 3, p. 135-141.

- GOMBERT, J. 2016. Projet DIAPOCAR : Etude de *Diaporthe angelicae*, champignon ré-émergent responsable des grillures d'ombelles en production de semence de carotte. Rapport final. FNAMS.
- GOMBERT, J. 2016. Les grillures d'ombelles en production de semences de carotte : Mieux connaître le *Phomopsis* pour mieux le contrôler. Bulletin semences 251, p 37 -41
- GOMES, R.R., GLIENKE, C., VIDEIRA, S.I.R., LOMBARD, L., GROENEWALD, J.Z. et CROUS, P.W., 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. In : *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. Vol. 31, p. 1-41.
- GOODWIN, D. C. et LEE, S. B., 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. In : *BioTechniques*. Vol. 15, n° 3, p. 438, 441-442, 444.
- GUAN, Y. M., LU, B. H., WANG, Y., GAO, J. et WU, L. J., 2013. First Report of Root Rot Caused by *Fusarium redolens* on Ginseng (*Panax ginseng*) in Jilin Province of China. In : *Plant Disease*. Vol. 98, n° 6, p. 844-844.
- HAAPALAINEN, M., LATVALA, S., KUIVAINEN, E., QIU, Y., SEGERSTEDT, M. et HANNUKALA, A. O., 2016. *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum* and *F. redolens* associated with basal rot of onion in Finland. In : *Plant Pathology*. Vol. 65, n° 8, p. 1310-1320.
- HARROW, S.A., FARROKHI-NEJAD, R., PITMAN, A.R., SCOTT, IAN A.W., BENTLEY, A., HIDE, C. et CROMEY, M.G., 2010. Characterisation of New Zealand *Fusarium* populations using a polyphasic approach differentiates the *F. avenaceum*/*F. acuminatum*/*F. tricinctum* species complex in cereal and grassland systems. In : *Fungal Biology*. Vol. 114, n° 4, p. 293-311.
- HEMPHILL, C. F., SUREECHATCHAIYAN, P., KASSACK, ORFALI, R.S., LIN, W., DALETOS, G. et PROKSCH, P., 2017. OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum*. In : *The Journal of Antibiotics*. Vol. 70, p. 726-732.
- HOCH, H. C., GALVANI, C. D., SZAROWSKI, D. H. et TURNER, J. N., 2005. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. In : *Mycologia*. Vol. 97, n° 3, p. 580-588.
- HYUN JUNG, K., YONG KEEL, C. et BYUNG RE, M., 2001. Variation of the Intergenic Spacer (IGS) Region of Ribosomal DNA among *Fusarium oxysporum* formae speciales. In : *The Journal of Microbiology*. Vol. 39, n° 4, p. 265-272.
- IGNJATOV, M., MILOŠEVIĆ, D., NIKOLIĆ, Z., GVOZDANOVIĆ VARGA, J., TATIĆ, M., POPOVIĆ, T. et IVANOVIĆ, Ž., 2016. First Report of *Fusarium tricinctum* Causing Rot of Garlic Bulbs in Serbia. In : *Plant Disease*. Vol. 101, n° 2, p. 382-382.
- JOHN F.L et BRETT A., Summerell, 2008. *The Fusarium Laboratory Manual*. S.I. : John Wiley & Sons.
- JOSEPH-HORNE, T., HOLLOMON, D. W. et WOOD, P.M., 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Vol. 1504, n° 2, p. 179-195.
- JOUBERT, A., CALMES, B., BERRUYER, R., PIHET, M., BOUCHARA, J., SIMONEAU, P. et GUILLEMETTE, T., 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. In : *BioTechniques*. Vol. 48, n° 5, p. 399-404.
- KOKKONEN, M., OJALA, L., PARIKKA, P. et JESTOI, M., 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. In : *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 143, n° 1-2, p. 17-25.
- LEE, H.W., NGUYEN, T.T.T. et LEE, H.B., 2016. First Report of Post-Harvest Fruit Rot of *Aronia melanocarpa* Caused by *Fusarium tricinctum* in Korea. In : *The Korean Journal of Mycology*. Vol. 44, n° 1, p. 68-71.
- LI, J., LI, H., ZHENG, L., YAN, S. L. et WANG, Q. Z., 2016. First Report of Lotus Root Disease Caused by *Fusarium tricinctum* in China. In : *Plant Disease*. Vol. 100, n° 8, p. 1784-1784.
- LI, Y. Y., WANG, Y. J., XIE, Z. K., WANG, R. Y., QIU, Y., PAN, H. Q. et HU, J. C., 2013. First Report of Lily Blight and Wilt Caused by *Fusarium tricinctum* in China. In : *Plant Disease*. Vol. 97, n° 7, p. 993-993.
- LIN, H-I., LEE, Y-J., CHEN, B-F., TSAI, M-C., LU, J-L., CHOU, C-J. et JOW, G-M., 2005. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. In : *Cancer Letters*. Vol. 230, n° 2, p. 248-259.
- LYNCH, P. T., COLLIN, H. A. et ISAAC, S., 1985. Isolation and regeneration of protoplasts from *Fusarium tricinctum* and *Fusarium oxysporum*. In : *Transactions of the British Mycological Society*. Vol. 135, p 135-140.
- MECA, G., RUIZ, M. J., SORIANO, J. M., RITIENI, A., MORETTI, A., FONT, G. et MAÑES, J., 2010. Isolation and purification of enniatins A, A1, B, B1, produced by *Fusarium tricinctum* in solid culture, and cytotoxicity effects on Caco-2 cells. In : *Toxicol.* Vol. 56, n° 3, p. 418-424.
- MISHRA, P. D., VEREKAR, S. A., DESHMUKH, S. K., JOSHI, K. S., FIEBIG, H. H. et KELTER, G., 2015. Altersolanol A: a selective cytotoxic anthraquinone from a *Phomopsis* sp. In : *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 60, n° 4, p. 387-391.
- MOREL, E., GOMBERT, J., and SERANDAT, I. (2013) Les grillures d'ombelles en production de semences de carottes et autres ombellifères : Etat de connaissances et méthodes de lutte. Bulletin Semences 230, p 24-25.
- MUTHAIYAN, M. C., 2009. Principles and Practices of Plant Quarantine. Allied Publishers Private Limited; 1 edition. 1150 p.
- NAZARI, F., SULYOK, M., KOBARFARD, F., YAZDANPANA, H. et KRŠKA, R., 2015. Evaluation of Emerging *Fusarium* mycotoxins beauvericin, Enniatins, Fusaproliferin and Moniliformin in Domestic Rice in Iran. In : *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. Vol. 14, n° 2, p. 505-512.



- NAZARI, L., MANSTRETTA, V. et ROSSI, V., 2016. A non-linear model for temperature-dependent sporulation and T-2 and HT-2 production of *Fusarium langsethiae* and *Fusarium sporotrichioides*. In : *Fungal Biology*. Vol. 120, n° 4, p. 562-571.
- NELSON, P.E., TOUSSOUN, T.A. et MARASAS, W.F.O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. University Park : Pennsylvania State University Press.
- NIESSEN, L., GRÄFENHAN, T. et VOGEL, R.F., 2012. ATP citrate lyase 1 (*acl1*) gene-based loop-mediated amplification assay for the detection of the *Fusarium tricinctum* species complex in pure cultures and in cereal samples. In : *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 158, n° 3, p. 171-185.
- PROSPERINI, A., MECA, G., FONT, G. et RUIZ, M.J., 2012. Study of the cytotoxic activity of beauvericin and fusaproliferin and bioavailability *in vitro* on Caco-2 cells. In : *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. Vol. 50, n° 7, p. 2356-2361. .
- RAVENEL, C, CASALS, M et CORBINEAU, F, 2012. Semence de carotte : La formation de la semence à la loupe. In : *Bulletin des Semences*. n° 227, p. 33 35.
- ROSSMAN, A. Y., FARR, D. F. et CASTLEBURY, L. A., 2007. A review of the phylogeny and biology of the *Diaporthales*. In : *Mycoscience*. Vol. 48, n° 3, p. 135 144.
- SUNDHEIM, L., BRODAL, G., HOFGAARD, I.S. et RAFOSS, T., 2013. Temporal Variation of Mycotoxin Producing Fungi in Norwegian Cereals. In : *Microorganisms*. Vol. 1, n° 1, p. 188 198.
- THRANE, U., 1991. FUSKEY, an interactive computer key to common *Fusarium* species. In : *Mycotoxin Research*. Vol. 7 Suppl 1, p. 50 53.
- TOMODA, H., HUANG, X. H., CAO, J., NISHIDA, H., NAGAO, R., OKUDA, S., TANAKA, H., OMURA, S., ARAI, H. et INOUE, K., 1992. Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. In : *The Journal of Antibiotics*. Vol. 45, n° 10, p. 1626-1632.
- UECKER, F. A, GARDEN, New York Botanical et AMERICA, Mycological Society of, 1988. A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. Berlin-Suttgart : J. Cramer. 231 p.
- VISCONTI, A. et SOLFRIZZO, M., 1995. Visoltricin, a novel biologically active compound produced by *Fusarium tricinctum*. In : *Food Additives and Contaminants*. Vol. 12, n° 3, p. 515-519.
- VON ARX, J.A., 1951. De phomopsisziekte van zaadwortelen. In : *Tijdschrift Over Plantenziekten*. Vol. 57, n° 2, p. 44-51.
- WANG, Q.i et XU, L., 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. In : *Molecules (Basel, Switzerland)*. Vol. 17, n° 3, p. 2367-2377.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. et TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : *PCR-Protocols : A guide to methods and applications*. Academic Press, pp 315-22
- YLI-MATTILA, T., PAAVANEN-HUHTALA, S., BULAT, S. A., ALEKHINA, I. A. et NIRENBERG, H.I., 2002. Molecular, morphological and phylogenetic analysis of the *Fusarium avenaceum*/*F. arthrosporioides*/*F. tricinctum* species complex –a polyphasic approach. In : *Mycological Research*. Vol. 106, n° 6, p. 655-669.
- ZINEDINE, A., MECA, G., MAÑES, J. et FONT, G., 2011. Further data on the occurrence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins (A, A1, B, B1), fusaproliferin and beauvericin in raw cereals commercialized in Morocco. In : *Food Control*. Vol. 22, n° 1, p. 1 5.

## Sitographie

- [1] : RENOU J.P. – 2015 – L'IRHS en quelques mots. [En ligne]. Disponible sur <http://www6.angers-nantes.inra.fr/irhs> (consulté le 3 mars 2017)
- [2] : GEVES – 2012 – Laboratoire Pathologie. [En ligne]. Disponible sur : <http://bit.ly/2o3h2hF> (consulté le 3 mars 2017)
- [3] : DESCLAUX C. – 2016 – Nos missions. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.fnams.fr/presentation/nos-missions-2/> (consulté le 3 mars 2017)
- [4] : DAVIOT D. – 2016 – Localisation des superficies présentées - Récolte 2016. [En ligne]. Disponible sur : <http://bit.ly/2p39X1t> (consulté le 8 mars 2017)
- [5] : DAVIOT D. – 2016 – L'environnement réglementaire des semences. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.qnis.fr/index/action/page/id/24> (consulté le 9 mars 2017)
- [6] : GHAFAR A. et HUDRISIER D. – 2014 - IMMUNOLOGIE - CHAPITRE DIX-SEPT REACTIONS D'HYPERSENSIBILITE. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter17.htm> (consulté le 8 mars 2017).
- [7] : Directeur général de l'ANSES – 2015 – Avis de l'Anses Saisine n° 2010-SA-0058. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à «la demande d'actualisation des résultats de la deuxième étude de l'alimentation totale (EAT2) relatifs à l'exposition des consommateurs aux toxines T2 et HT2 à la lumière de la nouvelle valeur toxicologique de référence établie par l'EFSA ». [En ligne]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2012sa0058.pdf> (consulté le 8 mars 2017)

[8] : Directeur général de l'ANSES – 2016 – Avis de l'Anses Saisine n° 2015-SA-0076. AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « l'analyse des Plans de Surveillance et de Contrôle sur les substances indésirables en alimentation animale ». [En ligne]. Disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/system/files/ERCA2012sa0058.pdf> (consulté le 8 mars 2017)

[9] : CORPET F., 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890 "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". [En ligne]. Disponible sur : <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> (consulté le 13 avril 2017)

[10] : McGUINTY L. – 2017 – Common Names of Plant Diseases: Carrot. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Carrot.aspx> (consulté le 18 juillet 2017)

ANNEXE I : Mycotoxines produites par *Fusarium tricinctum* (Suite)

Mycotoxines	Effets	Informations complémentaires	Publications
<b>Trichothécènes Groupe A T-2 et HT-2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effets immunotoxiques</li> <li>- Effets hématotoxiques.</li> <li>- Inhibition de la synthèse protéique chez les eucaryotes (phase initiation, élongation et terminaison)</li> <li>- Induction de l'apoptose sur les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules immunitaires</li> </ul>	Dose journalière 60 ng.kg.pc <sup>-1</sup>	(Fremy, 2010 ; Aniołowska et Steininger, 2014 ; Gauthier, 2016 ; [7])
<b>Trichothécènes Groupe B Fusarénone X</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Altération des immunoglobulines</li> </ul>		(Fremy, 2010)
<b>Zéaralénone</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effets mimétiques des œstrogènes, troubles de la fertilité et de la reproduction (liaison aux récepteurs œstrogéniques, bioactivation par des déshydrogénases et conjugaison aux glucuronyltransférases)</li> </ul>	Dose journalière 0.25 µg.kg Dans la liste établie par les autorités françaises pour l'analyse des risques dans l'alimentation animale	(Caldwell <i>et al.</i> , 1970 ; EFSA, 2011 ; Aniołowska et Steininger, 2014 ; [8])
<b>Fusariéline A, B, J, K, L</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité antibiotique</li> <li>- Activité antifongique pour la fusariéline A</li> <li>- Activité antibactérienne pour la fusariéline B (les autres ne présentent que très peu d'activité ou n'ont pas encore été testées)</li> </ul>	Production par approche OSMAC (One Strain MAny Compounds)	(Hemphill <i>et al.</i> , 2017)

## Annexes

### ANNEXE I : Mycotoxines produites par *Fusarium tricinctum*

Mycotoxines	Effets	Informations complémentaires	Publications
<b>Visoltricine et N-méthyl visoltricine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité anticholinestérase</li> </ul>		(Visconti et Solfrizzo, 1995)
<b>Enniatine A, A1, B, B1, B4 et J1</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Molécules ionophores inhibitrices d'enzymes comme la cholestérol-acétyltransférase chez l'Homme</li> <li>- Activité antifongique</li> <li>- Activité antimicrobienne</li> <li>- Molécules immunomodulatrices</li> </ul>	EFSA a conclu qu'une exposition aigue n'est pas nocive pour l'Homme mais pas de conclusions sur une consommation chronique	(Meca <i>et al.</i> , 2010 ; Zinedine <i>et al.</i> , 2011 ; Cuomo <i>et al.</i> , 2013 ; EFSA, 2014 ; Nazari <i>et al.</i> , 2015)
<b>Beauvericine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité antitumorale sur NSCLC</li> <li>- Activité antimicrobienne</li> <li>- Génotoxicité et cytotoxicité sur les lymphocytes humains et animaux (micronuclei, aberration chromosomique). Provoque également l'apoptose et des disfonctionnements des mitochondries et des érythrocytes.</li> <li>- Inhibiteur spécifique de la cholestérol-acyltransférase</li> </ul>	EFSA a conclu qu'une exposition aigue n'est pas nocive pour l'Homme mais pas de conclusions sur une consommation chronique	(Tomoda <i>et al.</i> , 1992 ; Zinedine <i>et al.</i> , 2011 ; Wang et Xu, 2012 ; Cuomo <i>et al.</i> , 2013 ; EFSA, 2014 ; Nazari <i>et al.</i> , 2015)
<b>Fusaproliferine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxicité pour les lymphocytes B humains</li> <li>- Toxicité pour les cellules Caco-2</li> <li>- Agent tératogène</li> </ul>		(Zinedine <i>et al.</i> , 2011 ; Cuomo <i>et al.</i> , 2013 ; Nazari <i>et al.</i> , 2015)
<b>Fusarine C</b>	Agent cancérogène et anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN		(Sundheim <i>et al.</i> , 2013)
<b>Moniliformine</b>	Très peu d'études conduites, cependant la moniliformine provoquerait des cardiomyopathies		(Kokkonen <i>et al.</i> , 2010 ; Sundheim <i>et al.</i> , 2013 ; Nazari <i>et al.</i> , 2015)

**ANNEXE II : Protocole d'extraction d'ADN génomique de champignon par micro-ondes**  
(Goodwin et Lee, 1993)

- 1 – Prélever un échantillon de mycélium sur une culture solide, en limitant la quantité de gélose, et le placer dans un tube Ependorff de 1,5 mL
- 2 – Ajouter 100 µL de tampon de lyse (Tris-HCl pH = 7,2 à 50 mM, 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoéthanol)
- 3 – Placer le reste du tampon de lyse au bain marie à 80 °C
- 4 – Placer l'échantillon au four à micro-ondes (maximum, 850W) avec bouchon ouvert pendant 15 sec, puis 10 sec, puis 5 sec (entre chaque étape de chauffage, attendre 5 à 10 sec)
- 5 – Ajouter 300 µL de tampon de lyse à 80°C (Vol. total = 400 µL)
- 6 – Incuber les tubes fermés à 80 °C pendant 10 min
- 7 – Ajouter 1 volume (400 µL ici) de mélange de chloroforme-Alcool isoamylique, vortexer 15 sec
- 8 – Centrifuger à 15 000g pendant 15 min
- 9 –Récupérer la phase aqueuse (environ 350 µL) et la placer dans un nouveau tube
- 10 – Ajouter 10 µL d'acétate de potassium (5M) et 0,5 volume d'isopropanol (180 µL ici)
- 11 – Incuber 5 min dans la glace
- 12 – Centrifuger 10 min à 10 000g
- 13 – Eliminer le surnageant et laver le culot dans 250 µL d'éthanol 80% (centrifuger 5 min à 10 000g puis éliminer le surnageant)
- 14 – sécher le culot à l'évaporateur rotatif ('Speed-vac') 5 min
- 15 – Reprendre le culot dans 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH8,0)

**ANNEXE III : Composition du milieu de sporulation SNA (pour 1 litre)**

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1.0 g
- KNO<sub>3</sub> : 1.0 g
- MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O : 0.5 g
- KCl : 0.5 g
- Glucose : 0.2 g
- Saccharose : 0.2 g
- Agar : 15 g
- 1 L H<sub>2</sub>O milli-Q

**ANNEXE IV : Composition du milieu de sporulation MS + Asparagine (pour 1 litre) (Lynch et al., 1997)**

- $K_2HPO_4$  : 10 g
- $MgSO_4 \cdot H_2O$  : 0.75 g
- Amidon de pomme de terre : 2.0 g
- Glucose : 2.0 g
- Extrait de levure : 0.05 g
- Asparagine : 1 g
- Agar : 20 g
- 1 L  $H_2O$  milliQ

**ANNEXE V : Fongicides, homologués en culture de porte-graine, testés en néphélométrie**


Nom	Matières actives	Famille	Mode d'action	Concentration finale appliquée (g/L)
Amistar® Syngenta	Azoxystrobine	Strobilurines	Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale	0.25
Topsin® Certis	thiophanate-méthyl	Benzimidazoles	Inhibition de la formation des tubulines	1.16
Luna Sensation® Bayer CropScience	Fluopyram	Pyridines	Inhibition de la succinate déshydrogénase de la chaîne de transport des électrons	0.2
	Trifloxystrobine	Strobilurines	Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale	0.2
Fandango® Bayer CropScience	Fluoxastrobine	Strobilurines	Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale	0.1
	Prothioconazole	Triazoles	Inhibition d'une étape de déméthylation de la voie de biosynthèse de l'ergostérol	0.2
Veg`Lys® Phytoauxilium	Propyl propane thiosulfinate/thiosulfonate (PTS / PTSO)	Aromatiques soufrés	-	Dilution 100/1000

**ANNEXE VI : Matrice de phénotypage complète des 15 souches de *Fusarium* sur différents milieux de culture**

	<b>Souche</b>	<b>FS1</b>	<b>FS2</b>	<b>FS3</b>	<b>FS4</b>	<b>FS5</b>	<b>FS6</b>	<b>FS7</b>	<b>FS8</b>	
<b>Mycélium (PDA)</b>	Aspect et contour du mycélium	Aérien, compact, haut, net	Aérien, compact, dôme, diffus	Aérien, compact, haut, net	Aérien, compact, net	Aérien, compact, net	Aérien, compact, haut, net	Aérien, compact, net	Aérien, compact, diffus	
	Couleur du mycélium	Jaune/rose	Blanc/jaune	Jaune/rose	Jaune/brun	Rose pâle/blanc	Rose/jaune	Jaune/rose	Rose pale	
	Pigmentation gélose	Brun	Marron	Brun rosé	Marron	Carmin	Carmin	Carmin	Carmin	
	Abondance	Moyenne	Abondant	Moyenne	Abondant	Absent	Absent	Moyenne	Très Faible	
<b>Macroconidies (SNA)</b>	Couleur des sporodochies	Orange	Blanchâtres	Orange	Orange	-	-	Orange	-	
	Répartition des sporodochies	Autour explant	Disséminés	Bords boites	Disséminés	-	-	Disséminés	-	
	Forme	Faucille	Bâtonnet	Croissant	Croissant	-	-	Croissant	Bâtonnet	
	Cloisons	5	3	4	4	-	-	4	-	
	Longueur (µm)	50-60	30-35	25-40	40-50	-	-	35-45	20-30	
	Taille section la plus large (µm)	2.5-3.5	2-3	2-3	3-4	-	-	2.5-3.5	2-3	
	Cellule basale	Allongée, courbée	Courte, arrondie	Moyenne, arrondie	Allongée, arrondie	-	-	Allongée, arrondie	Courte, arrondie	
	Cellule apicale	Biseauté	Biseauté	Biseauté	Biseauté	-	-	Biseauté	Courte, arrondie	
	<b>Microconidies (SNA)</b>	Abondance	Absent	Moyenne	Abondant	Absent	Peu abondant	Abondant	Abondant	Peu abondant
		Forme	-	Grain de riz	Citron	-	Grain de riz	Citron/poire	Citron/poire	Riz long
Type de phialide		-	Monophialide	-	-	Monophialide	Monophialide	Monophialide	-	
Aspect du conidiophore		-	Court, peu volumineux	Moyen, volumineux	-	Court, peu volumineux	Moyen, volumineux	Moyen, volumineux	Court, peu volumineux	
Chlamydozoospores		NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	
	<b>Souche</b>	<b>FS9</b>	<b>763304</b>	<b>PAS 48</b>	<b>PAS 50</b>	<b>F72/1</b>	<b>LBH 16 18</b>	<b>D1487</b>		
<b>Mycélium (PDA)</b>	Aspect et contour du mycélium	Aérien, compact, haut, diffus	Aérien, compact, net	Aérien, compact, diffus	Aérien, compact, haut, net	Aérien, compact, net	Aérien, compact, haut, net	Aérien, compact, net		
	Couleur du mycélium	Rose soutenu	Jaune/rose	Jaune/rose	Blanc/rose	Jaune/rose	Jaune/rose	Jaune/rose		
	Pigmentation gélose	Brun rosé	Rouge	Carmin	Carmin clair	Carmin	Carmin	Carmin		
	Abondance	Faible	Abondant	Absent	Absent	Moyenne	Moyenne	Abondant		
<b>Macroconidies (SNA)</b>	Couleur des sporodochies	-	Orange	-	-	Orange	Orange	Orange		
	Répartition des sporodochies	-	Disséminés	-	-	Disséminés	Disséminés	Disséminés		
	Forme	Croissant	Faucille	-	-	Croissant	Croissant	Croissant		
	Cloisons	4	4	-	-	4	4	4		
	Longueur (µm)	35-45	40-50	-	-	35-45	30-45	35-50		
	Taille section la plus large (µm)	2.5-4	2.5-3.5	-	-	3-4	3.5-4.5	3.5-4.5		
	Cellule basale	Allongée, arrondie	Allongée, courbée	-	-	Allongée, arrondie	Allongée, arrondie	Allongée, arrondie		
	Cellule apicale	Biseauté	Biseauté	-	-	Biseauté	Biseauté	Biseauté		
	<b>Microconidies (SNA)</b>	Abondance	Absent	Absent	Moyen	Abondant	Très abondant	Abondant	Abondant	
		Forme	-	-	Citron	Citron/poire	Citron/poire	Citron	Poire/citron	
Type de phialide		-	-	Monophialide	Monophialide	Monophialide	Monophialide	Monophialide		
Aspect du conidiophore		-	-	Moyen, volumineux	Moyen, volumineux	Moyen /vol	Moyen, volumineux	Moyen, volumineux		
Chlamydozoospores		OUI	NON	NON	NON	NON	NON	NON		





	Diplôme / Mention : Master 2 Sciences Technologie Santé Mention Biologie Agronomie Santé Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV) Parcours II : Sélection, Production et Valorisation des Végétaux (SPVV) Option : Qualité et Valorisation des végétaux Responsable d'option : DELEU Carole
Auteur(s) : CHATEAU Corentin Date de naissance* : 25/02/1994	Organisme d'accueil : IRHS Adresse : 42 rue Georges Morel 49070 Beaucouzé
Nb pages : 25    Annexe(s) : 6	Maîtres de stage : POUPARD Pascal, BASTIDE Franck, GOMBERT Julie
Année de soutenance : 2017	
Titre français : Etude de deux maladies chez la carotte porte-graine causées par les espèces fongiques <i>Fusarium tricinctum</i> et <i>Diaporthe angelicae</i>	
Titre anglais : Study of two diseases in carrot seed production caused by the fungal species <i>Fusarium tricinctum</i> and <i>Diaporthe angelicae</i>	
<p>Résumé (1600 caractères maximum) : Récemment, en culture de carotte porte-graine, un nouveau pathogène, <i>Fusarium tricinctum</i>, et un pathogène ré-émergent, <i>Diaporthe angelicae</i>, ont été identifiés.</p> <p>Dans ce mémoire, 15 souches de <i>Fusarium</i> ont été étudiées. Des analyses phénotypiques et moléculaires se basant sur les régions ITS de l'ADNr et sur le gène de la <math>\beta</math>-tubuline ont d'abord permis l'identification de 10 souches de <i>F. tricinctum</i> et de 5 souches de trois espèces différentes : <i>F. avenaceum</i>, <i>F. culmorum</i> et <i>F. redolens</i>. Un screening <i>in vitro</i> de sensibilité de 2 souches de <i>F. tricinctum</i> à 4 fongicides et à un extrait d'Alliacées a ensuite été mené. Les résultats montrent que les fongicides ne sont pas efficaces, mais que l'extrait d'Alliacées (le Veg`Lys®), permet l'inhibition de la germination de 99% des conidies de ce pathogène. De plus, des tests de confrontation de souches de <i>F. tricinctum</i> avec des souches de <i>Trichoderma</i>, ont permis de mettre en évidence la non efficacité des souches commerciales contre ce pathogène mais de mettre en avant les propriétés de parasitisme d'une souche marine de <i>Trichoderma</i> issue du laboratoire MMS de Nantes.</p> <p>Dans un second temps, des observations microscopiques d'ombelles, contaminées artificiellement avec une suspension de conidies de <i>D. angelicae</i>, a permis de montrer qu'une pénétration du pathogène par les stomates à la base des styles de l'hôte existe. Enfin, Il a été mis en évidence que <i>D. angelicae</i> se situerait dans les vaisseaux de xylème et les cellules du parenchyme de l'hôte, ce qui indique que <i>D. angelicae</i> serait un pathogène vasculaire.</p>	
<p>Abstract (1600 caractères maximum) : Recently, two fungal pathogens were identified in French's carrot seed crops: as a new pathogen, <i>Fusarium tricinctum</i>, and a re-emerging pathogen, <i>Diaporthe angelicae</i>.</p> <p>In this work, 15 <i>Fusarium</i> strains and isolates from lesions on carrot crowns have been studied. Firstly, phenotypic and molecular typing based on ITS rDNA and <math>\beta</math>-tubulin sequences resulted in the identification of 10 <i>F. tricinctum</i> strains and 5 other strains belonging to three species: <i>F. avenaceum</i>, <i>F. culmorum</i> and <i>F. redolens</i>. Secondly, <i>in vitro</i> sensitivity tests of 2 <i>F. tricinctum</i> strains to 4 fungicides and 1 <i>Alliaceae</i> extract was performed demonstrating the non-sensitivity of these strains to the tested concentrations of the fungicides, whereas the <i>Alliaceae</i> extract (Veg`Lys®) was able to inhibit 99% of conidia germination. In addition, <i>in vitro</i> confrontations of three isolates of <i>F. tricinctum</i> against commercial and marine strains of <i>Trichoderma</i> sp., have been tested. Results showed that the two commercial strains were not suitable for biocontrol, while some parasitism properties were observed for the marine strain. In a second part, microscopic observations of artificially contaminated umbels showed that <i>D. angelicae</i> could penetrate the host through the stomata at the style basis. Finally, the localization of <i>D. angelicae</i> in xylem vessels and in parenchyma cells was observed highly suggesting that this fungus is a vascular pathogen.</p>	
Mots-clés : <i>Daucus carota</i> , grillures d'ombelle, nécrose racinaire, fongicides, <i>Trichoderma</i> Key Words: <i>Daucus carota</i> , umbel browning, root necrosis, fungicides, <i>Trichoderma</i>	

\* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires