IRIGAM - Identification de résistances à l'infection des grains par *Fusarium graminearum* et à l'accumulation des mycotoxines au sein des variétés de blé françaises grâce à la mise en place de nouvelles technologies de phénotypage

Lasserre Zuber P.[1], Chavée M.[1], Faure M.[2], Roche S.[3], Soudière O.[1], Muterrer J.[4], Maigniel J.-P.[2], Pousset E.[5], Lem P.[5], Leremboure M.[6], Devaux P.[7], Serre F.[3], Cadot V.[2], Saintenac C.[1]

[1] INRAE, Université Clermont Auvergne, UMR GDEC, F-63000 Clermont-Ferrand

[2] Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences, Beaucouzé, France

[3] INRAE, UE PHACC, F-63000 Clermont-Ferrand

[4] Institut de biologie moléculaire des plantes, UPR2357-CNRS, Strasbourg, France

[5] BioGEVES, Surgères, France

[6] Université Clermont Auvergne, Institut de Chimie, CNRS UMR 6296, F-63000 Clermont-Ferrand

[7] Florimond Desprez Veuve & Fils SAS, BP41, 3 Rue Florimond Desprez, F-59242 Capelle-en-Pévèle

Correspondance : cyrille.saintenac@inrae.fr

Résumé

La contamination des grains par les mycotoxines et notamment le deoxynivalenol (DON) est un problème sanitaire majeur chez les céréales. Cette étude a permis de comparer un ensemble exhaustif de méthodologies pour évaluer le taux de grains symptomatiques suite à une attaque de *Fusarium graminearum* et la contamination des farines par le DON pour permettre une évaluation en routine de ces caractères dans les programmes de sélection. Grace à ces nouvelles méthodologies, le projet a également mis en avant sept régions du génome de blé impliquées dans la résistance aux DON ainsi que des marqueurs moléculaires utilisables en sélection pour construire des variétés plus résistantes, un enjeu prioritaire pour la filière céréalière.

Mots-clés : Fusariose de l'épi, Deoxynivalenol, Phénotypage, Blé tendre

Abstract: Towards an improvement of wheat resistance to Fusarium head blight

Kernels contamination by mycotoxins and especially deoxynivaneol (DON) represents a major sanitary threat for the cereals. Here, we compared a set of different methodologies to evaluate *Fusarium* damaged kernels and DON contaminated flours. This will allow to routinely assessing these traits in breeding programs. Thanks to these methodologies, we identified seven wheat genomic regions involved in resistance to DON accumulation. Molecular markers associated with these regions are now available to breed for varieties with improved resistance, a high priority of the grain sector.

Keywords: Fusarium head blight, Deoxynivalenol, Phenotyping, Breadwheat

Introduction

Le deoxynivalenol (DON) aussi appelé vomitoxine, est une toxine synthétisée par les champignons appartenant au genre Fusarium et principalement par *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum*, deux des principaux agents responsables de la fusariose de l'épi (FHB, Fusarium Head Blight). Cette maladie, retrouvée sur l'ensemble des continents, affecte toutes les céréales et se manifeste par des desséchements/nécroses ponctuelles sur les épillets et un développement anormal des grains. Alors que

les pertes de rendement sont en moyenne de 0,2 t/ha/an en France, son impact sur la qualité sanitaire des grains dû aux contaminations par les mycotoxines est problématique. Dans un rapport publié en 2011 et suite à l'analyse de 20 000 produits alimentaires, l'ANSES conclut sur une nécessité de poursuivre les efforts pour réduire les expositions alimentaires envers les DON et les dérivés acétylés (ANSES, 2011).

Plusieurs moyens de lutte sont utilisés pour contrer ce pathogène et pour réduire la contamination des grains par les mycotoxines. A l'instar des autres maladies fongiques, l'un des moyens de lutte largement utilisé est l'utilisation de fongicides. Cependant, dans le meilleur des cas, les substances actives ont une efficacité de 60-70 % et doivent être utilisées impérativement en préventif dans une fenêtre très courte, une pulvérisation sur épis symptomatiques n'ayant que peu d'effet. Une des alternatives ou voie complémentaire les plus prometteuses pour lutter contre ce pathogène et réduire l'utilisation de fongicides est l'utilisation de variétés de blé résistantes. Plusieurs types de résistance ont été décrits: type I (résistance à la pénétration du champignon), type II (résistance à la propagation du pathogène au sein de l'épi), type III (résistance à l'infection des grains, RKI) et type V (résistance à l'accumulation de mycotoxines dans les grains, RTA) *(*Buerstmayr *et al.,* 2009; Mesterhazy, 1995*)*. La génétique de la résistance au FHB se caractérise par très peu de QTL à effet majeur et par des dizaines de QTL à effet mineur (Buerstmayr *et al.,* 2009).

L'évaluation des symptomes causés par FHB est réalisé principalement de manière visuelle qui sont dépendantes du notateur, demandant des spécialistes pour obtenir des notes robustes et répétables, et avec un moyen débit. De plus, dans certains cas, la distinction entre des épis ou des grains fusariés par *Fusarium graminearum* ou *culmorum* et par *Microdochium sp.,* est difficile à estimer de part des nuances souvent très subtiles, même pour un expert dans le domaine. Ces estimations manquent de précision surtout quand les valeurs du paramètre sont faibles ou intermédiaires. En parallèle à ces évaluations visuelles, la teneur en mycotoxines est réalisée classiquement par chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (HPLC/MS-MS). Ces techniques sont très coûteuses, très lourdes à mettre en œuvre et non adaptées à l'étude de plusieurs dizaines d'échantillons. Pour l'ensemble de la filière céréalière, il est ainsi indispensable de faire évoluer rapidement ces techniques de phénotypage en levant différents verrous et en suivant différents objectifs en fonction des acteurs concernés.

La grande majorité des études de génétique se sont focalisées sur l'étude des résistances de type II. Celles-ci sont moins influencées par l'environnement et sont donc plus facile à évaluer. Très peu de QTL ont été identifiés comme conférant une résistance de type III ou de type V. Il existe ainsi une marge significative de manœuvre pour améliorer la résistance aux mycotoxines en exploitant ce type de résistance. Les études précédentes ont été réalisées à partir de l'estimation du pourcentage de grains fusariés et la teneur des grains en mycotoxines. Or, ces données restent significativement corrélées avec les résistances de type I et II et ne reflètent pas correctement les résistances de type III et V. Ainsi, la plupart des QTL identifiés pour des résistances de type III ou V co-localisent avec des QTL de résistance de type I ou II *(*Lemmens *et al.*, 2005*)*. Pour identifier des résistances de type III ou V décorrélées des phénomènes de pénétration et de propagation du pathogène, il est impératif de disposer de plusieurs données de phénotypage. En effet, pour évaluer la résistance de type III, il est nécessaire de mettre en parallèle les données relatives à la présence du champignon dans les grains avec l'aspect des grains et d'identifier des individus montrant un écart significatif entre ces deux paramètres. De même, l'évaluation des résistances de type V repose sur une évaluation conjointe entre la présence du champignon dans les grains et leur teneur en mycotoxines *(*Sneller *et al.,* 2012*)*. Ces analyses n'ont encore jamais été réalisées à large échelle de par leur lourdeur et leur coût. Parmi les deux études de génétique d'association publiées jusqu'à présent, seul un phénotypage sur épis a été réalisé (Kollers *et al.*, 2013; Miedaner *et al*., 2011). Une des résistances de type V décrites dans la littérature est la production de mycotoxines « masquées » (Buerstmayr *et al.,* 2009). Non toxiques pour la plante et accumulées dans les vacuoles, ces dernières résultent majoritairement de modifications du DON par le système de défense de la plante. Le dérivé le plus connu est le D3G. Il a été trouvé dans 5 % des échantillons étudiés par les

autorités Européennes entre 2007 et 2012 et il a été détecté dans les récoltes de blé aux États-Unis *(*Ovando-Martínez *et al.*, 2013*)*. Ceci démontre que ce mécanisme de résistance est potentiellement assez répandu chez les variétés de blé. D'autres composés ont été découverts récemment comme le DON-glutathione et le DON-S-cysteinyl-glycine et très récemment comme le DON-3-sulfate et le DON-15-sulfate. Ils pourraient être aussi des produits de détoxification liés à des mécanismes de défense de la plante *(*Kluger *et al*., 2013 ; Warth *et al.*, 2015*)*. D'autres formes masquées peuvent être produites par des bactéries ou des levures et les mécanismes responsables de ces changements pourraient conduire à améliorer la résistance du blé par la voie de la transgénèse. Cependant, il faut etre conscient que ces mycotoxines masquées peuvent etre métabolisées en leur forme d'origine lors de la digestion d'aliments contaminés et redevenir toxiques (Gonzalez-Arias *et al.*, 2013). Ainsi, meme si il est tout a fait pertinent d'étudier les mécanismes de la plante qui conduisent à la production de ces formes masquées car la transformation du DON en ces formes entraîne une reduction significative de la maladie et du taux global de DON dans les épis, ces formes masquées doivent faire l'object d'un suivi au sein des aliments au meme titre que la DON.

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel végétal

Toutes les analyses conduites ont été basées sur des grains de 220 variétés de blé d'origine majoritairement française et issu du projet national d'Investissement d'Avenir BreedWheat. Ce panel a été phénotypé au champ pour la résistance à la fusariose de l'épi en 2013 sur la station de INRAE de Clermont-Ferrand dans un dispositif de quatre répétitions randomisées. L'ensemble des cultivars a été infecté artificiellement pour 3 des 4 répétitions au stade floraison avec la souche FG1 de *Fusarium graminearum* (souche pathogène mycotoxinogène) et les grains récoltés à maturité. Des lots de 1000 grains ont été réalisés à l'aide d'un séparateur de grains par gravité pour éviter un échantillonnage biaisé. Les grains de 10 variétés françaises, témoins dans les essais du CTPS et récoltés lors d'un des essais d'évaluation de la résistance à la fusariose de l'épi ont complété le panel de grains utilisés. Une liste de 20 variétés de blé française d'hiver ayant des résistances différentes à la fusariose de l'épi a été sélectionnée pour les 4 essais au champ prévus dans le projet (2 essais par an (2016 et 2017) sur deux sites (INRAE Clermont-Ferrand et GEVES de l'Anjouère sous inoculation artificielle avec *F. graminearum*). Pour chaque variété, site et année, 5 épis ont été récoltés et photographiés avec la caméra hyperspectrale.

1.2 Méthodologies grains

Le VideometerLab 3 est un imageur multispectral pour lequel un algorithme de détection des grains fusariés, Fusaspectral blé tendre, a été mis en place et est utilisé en routine depuis 2015, avec un convoyeur de grains pour évaluer les résistances variétales à la fusariose de l'épi au GEVES (Cadot *et al.*, 2015). Cet algorithme permet de calculer le taux de grains fusariés, à raison de 1000 grains en 5 minutes. Le VideometerLab 3 est constitué d'une caméra numérique (2056x2056 pixels), d'une sphère d'intégration avec 20 LEDS ou bandes spectrales allant de 375 à 970 nm. Un logiciel interne assure la calibration, l'acquisition et les analyses en multispectral de l'image et les calculs statistiques spécifiques à la méthodologie retenue. La résolution est de 45 µm/pixel.

Les lots de grains ont été étalés manuellement sur la vitre d'un scanner Epson perfection v750 pro avec un fond noir et scannés avec une résolution de 400ppp. L'approche ImageJ consiste à ne pas individualiser les grains, mais à considérer l'image dans son ensemble. Les paramètres (surface projetée totale des grains, texture pour évaluer l'aspect fripé, colorimétrie, tâches violacées) peuvent être alors mesurés globalement. Ces mesures peuvent être comparées entres les lots, y compris entre les lots d'effectifs différents, si on rapporte les valeurs obtenues à l'effectif réel du lot. Un lot de 30 images a été

évalué par 3 experts indépendants (1 à GDEC et 1 à PHACC, INRAE Auvergne-Rhône-Alpes et 1 au GEVES), à l'aide d'un outil d'annotation développé dans le cadre du projet et mis à disposition des experts sous la forme d'un outil ImageJ. Pour réaliser une notation, les experts ont manuellement annoté les grains présentant un défaut sur l'ensemble des images disponibles. Ces annotations sont associées à chaque image et les fichiers d'annotation peuvent être relus pour connaître à postériori le nombre et la position des grains annotés. Cela a permis d'optimiser les paramètres numériques de détection automatique des grains défectueux dans les différents lots, jusqu'à obtenir une corrélation acceptable entre les notations des experts et les résultats de l'analyse automatique.

Pour l'analyse NIRS (near infrared spectroscopy), les mesures ont été réalisées sur un spectromètre NIRS à Transformée de Fourier de chez Bruker Optics par BioGEVES. Les spectres ont été acquis sur une plage de 577 nombres d'onde couvrant une zone proche infrarouge allant de 3 594 cm^{-1} à 12 482 cm^{-1}. Une unique mesure NIRS par échantillon a permis la prédiction des deux critères d'évaluation de la fusariose sur les grains. En effet, le NIRS est une technique non-destructive qui permet de prédire plusieurs paramètres par une seule analyse courte (1 minute environ pour 800 grains). Le type de modèle utilisé est la régression des moindres carrés partiels (Partial Least Squares Regression ou PLSR). La PLSR consiste en une régression de la variable à prédire y sur des variables latentes déterminées en tenant compte à la fois de y et des variables prédictives, à savoir les intensités du spectre NIRS. La PLSR est la méthode la plus connue et utilisée en spectroscopie infrarouge. Afin d'enrichir la variabilité du set de calibration et d'améliorer la qualité de la prédiction, une implémentation des modèles a été réalisée avec une collecte de spectres issus de ce projet IRIGAM et estimés comme étant les plus différents par l'algorithme de Kennard-Stone. Le modèle FDK initial développé par BIOGEVES a été implémenté avec un set de 52 spectres IRIGAM alors que le modèle DON a été implémenté avec un set de 43 échantillons IRIGAM.

1.3 Méthodologies farines

La PCR en temps réelle a été utilisée pour quantifier la biomasse fongique sur les farines. Le gène Betatubuline de *F. graminearum* a été sélectionné pour évaluer la masse fongique et le gène phytochelatine du blé pour permettre la normalisation des données. La masse fongique des 160 lots a été réalisée grâce à l'utilisation du mix LightCycler® 480 SYBR Green I master à l'aide de l'appareil LightCycler 480 sur quatre répétitions techniques à une température d'appariement de 68°C. Le ratio masse Fg/Plante a été utilisé pour une quantification absolue de la masse fongique. Ceci a nécessité la construction de gammes étalon afin de calculer la masse fongique et la masse végétale absolue pour chacun des échantillons et obtenir le ratio des concentrations [masse Fusa. g.]/[Masse *Triticum. ae*.]. La gamme étalon pour le champignon a été réalisée à partir de l'ADNg de *Fusarium graminearum*.

Deux méthodologies ont été utilisées pour évaluer directement le niveau de contamination des grains par les mycotoxines. Un test ELISA (Ridascreen fast DON) a permis de quantifier le DON et la chromatographie liquide suivie d'une spectrométrie de masse ont été utilisées pour quantifier le DON, le 15-acétyl-DON et le 3-glucoside-DON. Cette dernière méthodologie constitue la référence pour quantifier le DON et les autres mycotoxines et a été réalisée par l'institut de Chimie de l'université Clermont Auvergne.

1.4 Méthodologies épis

La caméra hyperspectrale NEO HySpex de l'unité AGAP de INRAE Montpellier (216 bandes spectrales du visible au proche infrarouge entre 400nm et 1000nm) a été utilisée pour évaluer les symptômes sur épis.

Les méthodes de sélection des longueurs d'ondes retenues sont des méthodes d'apprentissage supervisées. La première étape a consisté à créer une base d'apprentissage. La base d'apprentissage constitue un ensemble de données pour lesquelles la classe d'appartenance (fusarié ou non fusarié) est connue. Pour cela, sur un ensemble d'images (d'épis), les surfaces avec ou sans symptômes de fusariose ont été définies visuellement par un expert. Les pixels de ces surfaces ont constitué une référence pour la mise en place des algorithmes de sélection des longueurs d'ondes. Celle-ci est composée de 250 000 pixels issus de 76 épis 2016 (50% pixels « sains » /50% pixels «fusariés») et de 250 000 pixels issus de 30 épis 2017 (50% pixels « sains » /50% pixels « fusariés »).

Des références ont été élaborées afin de valider les longueurs d'ondes sélectionnées par les algorithmes. Afin de valider les longueurs d'onde sélectionnées comme pertinentes pour identifier la fusariose sur épi, plusieurs données de références ont été élaborées. Pour chaque épi 2016 et 2017, des notes visuelles ont été données par trois experts à partir des images. Pour 394 épis 2017, des notes visuelles ont été données par un expert sur l'épi avant l'acquisition hyperspectrale. Pour 579 épis 2016 et 2017, les zones présentant des symptômes de fusariose ont été repérées visuellement par un expert sur chacune des images.

1.5 Etude d'association

Pour identifier les régions génomiques impliquées dans les résistances à la fusariose, une approche de génétique d'association a été conduite sur le panel de 220 variétés de blé en utilisant les données de génotypage produite dans le cadre d'un autre projet et en utilisant l'ensemble des données de phénotypage produites dans le cadre de ce projet. L'ensemble des analyses a été conduites sous R et avec le package GenABEL. Un modèle d'Analyse de variance (ANOVA) a été utilisé pour corriger les effets blocs et pour obtenir les moyennes ajustées pour chaque variable. Le modèle Kinship (TRAIT ~ SNPmarker + POLYGENIC EFFECTS(K) + ERROR) prenant en compte l'apparentement entre individus dans le panel a ensuite été choisi pour conduire les analyses d'association.

2. Résultats

2.1 Comparaison et développement de technologies de phénotypage pour évaluer les symptômes liés au FHB

2.1.1 Phénotypage à partir des farines et des grains

Un sous-panel de 100 cultivars a été sélectionné parmi les 220 cultivars du panel d'origine issu du projet BreedWheat (90 cultivars) et parmi les cultivars de référence utilisés par le GEVES (10 cultivars) en incluant des variétés sensibles, modérément résistantes et tolérantes à la fusariose de l'épi. Pour chaque cultivar, 3 lots de 1000 grains (300 lots au total) ont été échantillonnés et six méthodologies de phénotypage sur grains (poids de mille grains, notation visuelle, VideometerLab 3, ImageJ, Script python et le NIRS) et trois méthodologies sur farine (qPCR, Elisa et HPLC-MS) ont été utilisées pour analyser les mêmes échantillons, soit un total de 3000 données de phénotypage.

Une très bonne répétabilité du phénotype a été observée suivant les trois répétitions techniques pour chacun des phénotypes évalués, suggérant que la méthodologie d'échantillonnage permet d'obtenir des lots identiques et que les méthodologies d'évaluation sont reproductibles.

Les méthodologies de phénotypage ont ensuite été comparées deux à deux (Figure 1). De très bonnes corrélations sur grains sont observées entre la méthodologie visuelle, le VideometerLab 3, ImageJ et le script Python (R Spearman>=0.92). Les corrélations sont un peu moins fortes avec l'évaluation NIRS (R>=0.89) même si cette dernière présente une forte corrélation avec le VideometerLab 3 (R = 0.95). Les corrélations sont plus faibles avec le poids de mille grains, même si elles restent intéressantes (R<=-0.66).

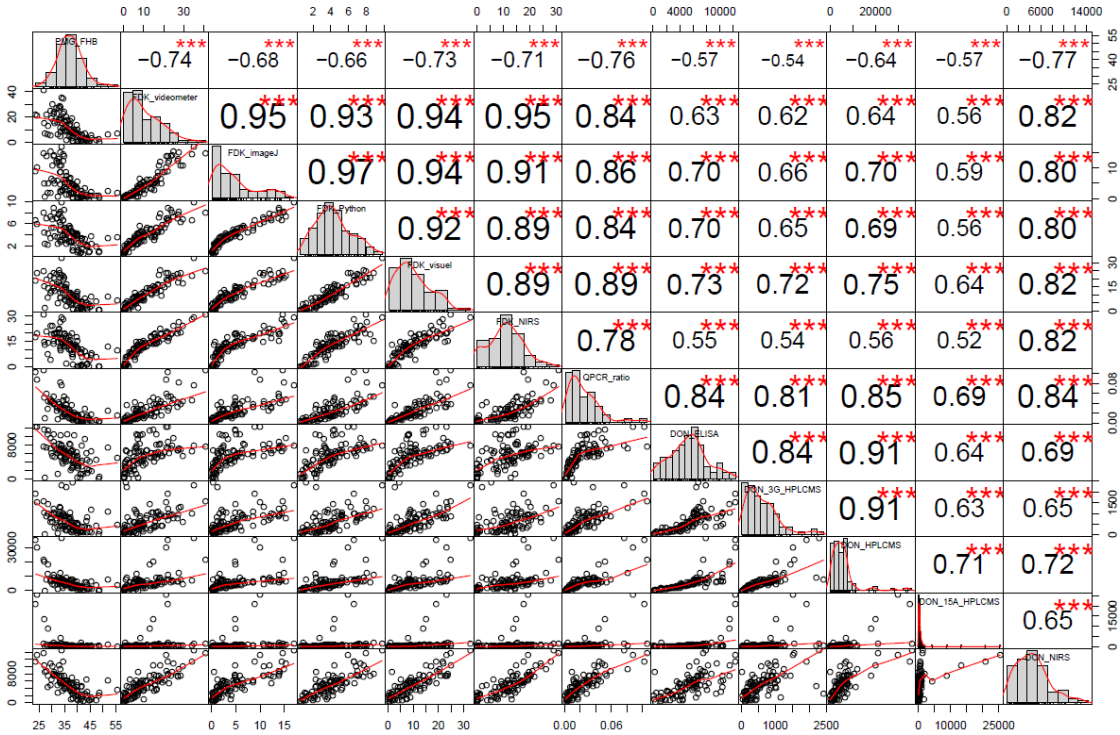


Figure 1 : Corrélations de Spearman entre les différentes méthodologies de phénotypage sur grains et sur farines pour les 300 lots étudiés. Dans la partie gauche du graphique sont représentés les graphiques de corrélation entre les variables avec la courbe de tendance. La distribution des données pour chaque variable est représentée sur la diagonale de la figure. Enfin, les corrélations de Spearman entre les variables deux à deux sont indiquées dans la partie droite avec leur niveau de significativité. PMG_FHB = Poids de mille grains ; FDK_Videometer = FDK évalué à l'aide du VideometerLab 3 ; FDK_ImageJ = FDK évalué à l'aide du logiciel Image J ; FDK_Python = FDK évalué à l'aide d'un script Python ; FDK_visuel = Fdk évalué visuellement par des experts ; FDK_NIRS = FDK évalué par la méthodologie NIRS ; QPCR_ratio = évaluation de la masse fongique par PCR en temps réelle ; DON_ELISA = teneur en DON évaluée par des tests ELISA ; DON_3G_HPLCMS = teneur en toxine DON-3G évaluée par HPLCMS ; DON_HPLCMS = teneur en DON évaluée par HPLCMS ; DON_15A_HPLCMS = teneur en 15ADON évaluée par HPLCMS et DON_NIRS = teneur en DON évaluée par NIRS.

En comparant les données pour chacune des méthodologies sur grains, un décalage a été observé entre le nombre absolu de grains fusariés identifiés (Figure 2). En considérant la méthode visuelle comme référence, le VideometerLab 3 a tendance à surestimer le nombre de grains fusariés alors qu'ImageJ et le script python ont tendance à le sous-estimer.

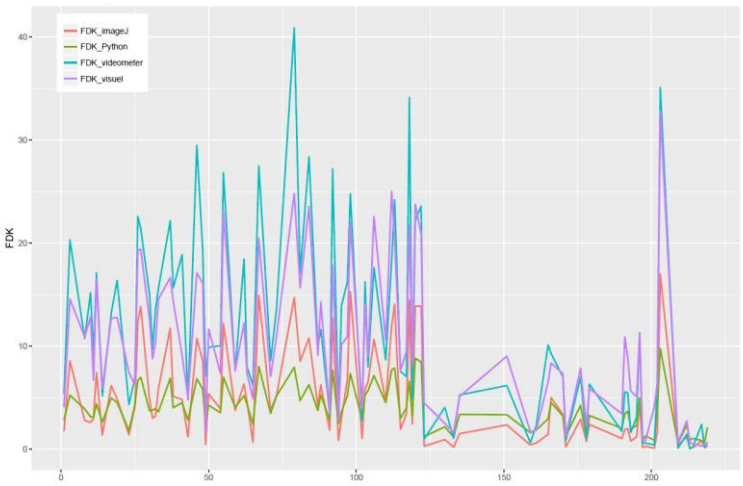


Figure 2: Comparaison des valeurs de FDK entre quatre méthodologies de phénotypage ImageJ, Python, VideometerLab 3 et Visuel). L'axe des abscisses représente les différentes variétés utilisées pour l'étude.

En ce qui concerne la détection des mycotoxines, une corrélation importante est observée entre les valeurs issues du test ELISA et les valeurs issues de HPLC-MS. La méthode de prédiction DON-NIRS (basée sur l'analyse des grains) présente une corrélation plus faible avec la méthode de référence par HPLC. La variable la plus prédictive de la quantité de DON est la méthode d'évaluation de la masse fongique par qPCR.

Alors que l'outil VideometerLab 3 est en test au GEVES depuis plusieurs années, l'outil ImageJ a été développé dans le cadre de ce projet. Pour faciliter l'utilisation de ce dernier par l'ensemble de la communauté, la mise à disposition de la méthode d'analyse dans le cadre d'un serveur d'analyse d'images en ligne a été privilégiée. Ce système, utilise l'infrastructure d'un serveur Galaxy, une plateforme accessible, reproductible et transparente pour la bioinformatique. (https://galaxyproject.org/). Un serveur Galaxy dédié au projet IRIGAM a été installé (Ubuntu 16.04.4 LTS ; Galaxy project release_18.05). Pour ce serveur un outil encapsulant les différentes étapes d'analyse d'images a été développé, aboutissant à l'évaluation du FDK (Accès au serveur de démonstration: http://irigam.ibmp.unistra.fr:8080/, Figure 3).

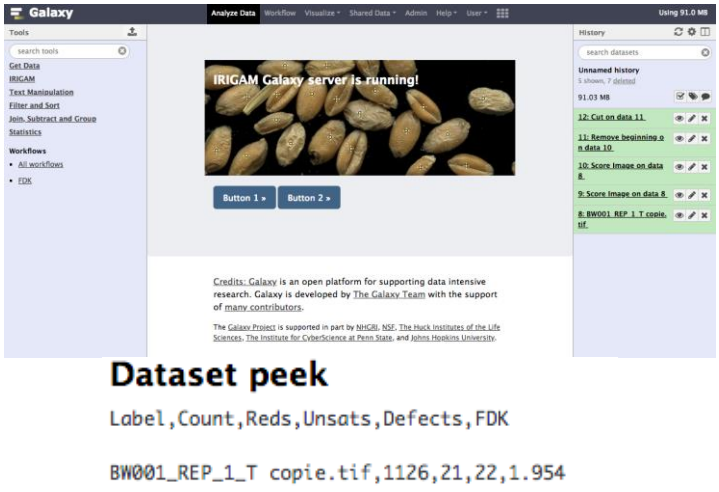


Figure 3: Interface Galaxie pour l'analyse du FDK et données de sortie de l'analyse ImageJ sur la plateforme Galaxie. Nom du fichier, nombre de grains présent sur l'image, nombre de grains de coloration violacée, nombre de grains présentant une désaturation et FDK calculé.

Concrètement, ce serveur permet l'envoi des images de grains de blé à évaluer, et l'application de la méthode d'analyse développée. Le script ImageJ est exécuté du côté serveur sans interaction avec l'utilisateur, et le FDK estimé est fourni en retour et archivé dans un historique des tâches. Pour l'image d'un lot de grains, le résultat fourni comprend le nom de l'image d'origine, le nombre de grains détectés dans l'image, le nombre de grains fusariés (présentant un phénotype de coloration violacée, et présentant un phénotype de désaturation), ainsi que le FDK calculé à partir de ces éléments (Figure 3). L'utilisation de la plateforme Galaxy permet d'envisager d'intégrer l'outil développé dans des workflows plus complexes, par exemple la récupération du FDK brut à partir du résultat du script primaire.

2.1.2 Evaluation de l'imagerie hyperspectrale pour la lecture de symptômes sur épis

L'objectif de cette action est d'évaluer la capacité de l'imagerie hyperspectrale à quantifier la fusariose sur épis afin de remplacer l'œil humain au champ. Il s'agit plus précisément de déterminer les longueurs d'onde les plus discriminantes pour identifier la fusariose sur épis afin de pouvoir les transférer à moyen terme dans une caméra multispectrale au champ.

Lors des deux années d'études du projet IRIGAM, 20 variétés de blé d'hiver ont été implantées et inoculés artificiellement avec *F. graminearum* sur deux sites. Ce dispositif a permis de constituer une base de données de 678 images hyperspectrales d'épis récoltés entre 250°C/j et 550°C/j après floraison. En

2016, 189 images hyperspectrales correspondent à 189 épis récoltés entre 310°C/j et 450°C/j après floraison. En 2017, 489 images hyperspectrales correspondant à 489 épis récoltés entre 245°C/j et 564°C/j après floraison.

Plusieurs méthodes de sélection ont été retenues pour analyser ces images et identifier les longueurs discriminantes entre les zones d'épis saines et infectées, à savoir l'analyse discriminante pas à pas (ADPP) séquentielle, la Covariance Selection (Covsel) et l'analyse discriminante pas à pas (ADPP) non séquentielle. Selon la méthode de sélection utilisée, des sous-ensembles de 2 à 5 longueurs d'onde (**λ)** ont été retenus à partir des différentes bases d'apprentissage crées. Les longueurs d'onde sélectionnées sont dans le visible et le proche infrarouge. Elles sont quasi similaires quelle que soit la méthode de sélection utilisée et reflètent la variation de teneur en chlorophylle et en eau entre les zones saines et fusariées (Figure 4). De plus, les longueurs d'onde sélectionnées sont très proches malgré l'utilisation de bases d'apprentissage différentes et basés sur des épis d'année différentes (2016, 2017 et 2016-2017). Ceci suggère que l'ensemble des méthodes de sélection semblent pertinentes pour identifier les longueurs d'onde discriminantes et que l'effet année ne semblent avoir que très peu d'influence sur cette sélection.

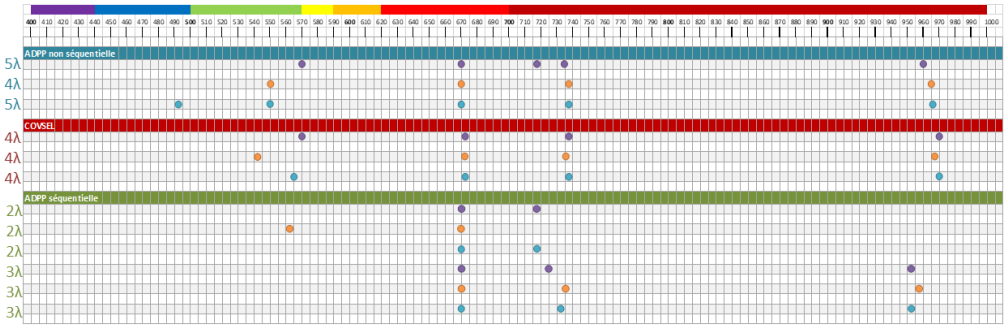


Figure 4: Longueurs d'onde sélectionnées (entre 400 et 1000 nm) suivant trois méthodes de sélection (ADPP non séquentielle, Covsel et ADPP séquentielle) et en fonction de plusieurs sous-ensemble de longueurs d'onde (de 2λ à 5λ) à partir des bases d'apprentissage 2016 (●), 2017 (●) et 2016-2017 (●).

Les longueurs d'onde sélectionnées ont ensuite été utilisées pour créer un modèle de classification des pixels pour chaque méthode de sélection. Ce modèle permet de classer les pixels de chaque épi en deux classes sain/fusarié et ainsi de calculer le pourcentage de pixels appartenant à la classe fusarié. Le pourcentage obtenu est ensuite comparé aux données de références pour valider les longueurs d'onde retenues. Les longueurs d'onde sélectionnées à partir des bases d'apprentissage 2016-2017 ont été comparées avec les bases de référence de 2016-2017 obtenues par expertise visuelle. Les coefficients de détermination R^2 entre les modèles et les données de références sont supérieurs à 0.86. De plus, les résultats sont similaires quel que soit le sous-ensemble de longueurs d'onde utilisé. Les 20 mêmes variétés de blé étant présentes sur deux sites différents pendant deux ans, l'impact du lieu, de l'année et du stade de développement des épis sur la capacité à identifier les zones fusariées avec ces modèles a été évalué. Il s'avère qu'il n'y a pas d'effet lieu, pas d'effet année et pas d'effet du stade de développement (sauf pour des données après 500°C/J) quelle que soit la méthode de sélection utilisée. Les longueurs d'onde identifiées sont donc applicables entre 350°C/J et 500°/J.

2.2 Identification des variétés de blé françaises résistantes à l'infection des grains et à l'accumulation des mycotoxines et des régions génomiques impliquées dans ce contrôle

L'ensemble des données de phénotypage a été utilisé pour réaliser une étude d'association (GWAS, Genome Wide Association Study) pour identifier les régions du génome du blé qui contrôlent ces résistances. Les données de FDK (ImageJ et visuel) et de teneur en mycotoxines (DON et DON-3G) ont

ainsi été utilisées. Pour la première fois, des nouvelles variables ont été utilisées, comme le rapport FDK/DON pour identifier des régions impliquées dans la résistance à l'accumulation des mycotoxines et le rapport FDK/sévérité pour identifier les résistances à l'infection des grains. Un total de quinze QTLs a été identifié sur onze chromosomes différents significativement associés à une variable (Tableau 1). Huit de ces QTL n'avaient pas été identifiés avec les données de sévérité et d'incidence et sont donc spécifiques de la résistance à l'infection des grains et de l'accumulation des mycotoxines. Par exemple, le QTL sur le chromosome 1A n'a été identifié que pour la variable DON-3G. Quatre QTL de résistance à l'accumulation des mycotoxines ont été détectés (DONs / FDK Image J) et deux QTL de résistance à l'infection des grains (FDK / sévérité 450). Le QTL 2B2 de résistance à l'accumulation des mycotoxines présente l'un des marqueurs SNP les plus associés à une variable. L'allèle de résistance, présent à une fréquence de 7% dans la collection de 220 variétés, entraîne une réduction de la teneur en DON de plus de 1000 µg/kg.

De plus, l'efficacité de détection de QTLs a été comparée pour un même caractère, le FDK, en utilisant les données issues d'une notation visuelle ou d'une notation par ImageJ. Quatre QTL ont été détecté uniquement en utilisant le FDK ImageJ et non avec la variable FDK visuel. Ceci semble suggérer que la nouvelle méthodologie développée est plus puissante et plus fine que la méthode visuelle pour les études d'association.

Tableau 1 : SNP significativement associés (-log10(pvalue) >4) aux différentes variables étudiées.

	1A	1D	2B1	2B2	4A	5A1	5A3	5B	6A1	6A2	6B1	6B2	6D	7A	7D
DON-3G	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
DON	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
DONs / FDK (Image J)	0	0	5	53	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
FDK (Image J)	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	4	2	1
FDK visuel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0
FDK / sévérité 450	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0

3. Discussion et conclusion

L'innovation variétale passe par la mise en place et l'utilisation d'outils de phénotypage de précision et à haut débit. Ce projet a permis pour la première fois de comparer un éventail exhaustif de méthodologies sur les mêmes lots de grains pour évaluer le pourcentage de grains fusariés, une mesure réalisée la plupart du temps de manière visuelle. Cette comparaison a mis en avant des méthodologies rapides et économiques mais également des technologies de précision plus onéreuses. Cette comparaison présente les différentes caractéristiques, avantages et inconvénients pour une large gamme de méthodologies permettant de répondre aux attentes différentes des acteurs de la filière céréalière. Le projet IRIGAM a montré qu'il existe une forte corrélation entre les données obtenues pour l'ensemble des méthodologies grains utilisées. Ceci offre un panel de méthodologies diverses pour étudier le FDK adapté aux besoins et aux objectifs de chacun. Lors de cette comparaison, une méthode d'analyse des grains fusariés a été développée, à l'aide du logiciel gratuit ImageJ, facile à mettre en œuvre par toutes personnes non expertes du domaine. Cet outil permet d'analyser près de vingt lots de grains par heure avec seulement un scanner de bureau. Il améliore également la détection de QTL par génétique d'association comparé aux méthodes d'analyse visuelle. Ceci représente une avancée importante pour

accélérer l'acquisition de ces données de phénotypage et ainsi le progrès génétique. Cependant, cette méthodologie doit être encore perfectionnée et notamment la portabilité avec différents scanners doit être évaluée. Il faut également tester si l'algorithme développé peut traiter des grains de variétés de blé plus exotiques dont l'origine est différente de ceux utilisés dans ce projet.

Suite à ces deux années, l'objectif d'identifier les longueurs d'onde correspondant à la fusariose sur épis par imagerie hyperspectrale est atteint. La robustesse de ces ensembles de longueurs d'onde pour détecter la fusariose de l'épi a été validée et un coefficient de détermination R^2 supérieur à 0.89 a été obtenu entre le taux de surface fusariée par analyse spectrale et les notations visuelles de référence. De plus, l'absence d'effet lieu entre le site de l'Anjouère (49-GEVES) et le site de Clermont-Ferrand (63-INRAE) et l'absence d'effet année entre 2016 et 2017 ont été montrées. Ces résultats ont été confirmés sur 2 années supplémentaires dans le projet Fus'eye (comm. perso, V. Cadot). Cette étape d'identification représente une étape clef dans la mise au point d'une caméra multispectrale pour évaluer les symptômes sur épis directement au champ.

Pour la première fois, de « vraies » résistances à l'infection des grains et à l'accumulation des mycotoxines, qui ne sont pas localisées au niveau des mêmes régions que des résistances de type I (pénétration du champignon) ou de type II (propagation du champignon), ont été identifiées. Des marqueurs SNP associés à ces résistances ont été identifiés et sont disponibles pour la sélection de variétés plus résistantes.

Remerciements

Nous remercions le Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, le CASDAR 2015 programme Semences et sélection végétale et l'ONEMA pour avoir soutenu ce projet.

Références bibliographiques

ANSES, 2011. Etude de l'alimentation totale française 2.

Buerstmayr H., Ban T., Anderson J.A., 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review. Plant Breeding *128*, 1–26.

Cadot V., Vadaine R., Demilly D., Maigniel J.-P., 2015 - Multispectral camera and imaging: a new tool for assessment of wheat resistance to Fusarium graminearum and preliminary study for assessment of DON content. In Book of abstracts of 13th European Fusarium Seminar, 10-14 may, Martina Franca (Italy), p. 160.

Gonzalez-Arias C.A., Marin S., Sanchis V., Ramos A.J., 2013. Mycotoxin bioaccessibility/absorption assessment using *in vitro* digestion models: a review. World Mycotoxin Journal 6, 167–184.

Kluger B., Bueschl C., Lemmens M., Berthiller F., Häubl G., Jaunecker G., Adam G., Krska R., Schuhmacher R., 2013. Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. Analytical and Bioanalytical Chemistry *405*, 5031–5036.

Kollers S., Rodemann B., Ling J., Korzun V., Ebmeyer E., Argillier O., Hinze M., Plieske J., Kulosa D., Ganal M.W., 2013. Whole Genome Association Mapping of Fusarium Head Blight Resistance in European Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). PLoS ONE *8*, e57500.

Lemmens M., Scholz U., Berthiller F., Dall'Asta C., Koutnik A., Schuhmacher R., Adam G., Buerstmayr H., Mesterházy Á., Krska R., 2005. The Ability to Detoxify the Mycotoxin Deoxynivalenol Colocalizes With a Major Quantitative Trait Locus for Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. Molecular Plant-Microbe Interactions *18*, 1318–1324.

Mesterhazy A., 1995. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. Plant Breeding *114*, 377–386.

Miedaner T., Würschum T., Maurer H.P., Korzun V., Ebmeyer E., Reif J.C., 2011. Association mapping for Fusarium head blight resistance in European soft winter wheat. Molecular Breeding *28*, 647–655.

Ovando-Martínez M., Ozsisli B., Anderson J., Whitney K., Ohm J.-B., Simsek S., 2013. Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in Hard Red Spring Wheat Inoculated with *Fusarium Graminearum*. Toxins *5*, 2522–2532.

Sneller C., Guttieri M., Paul P., Costa J., Jackwood R., 2012. Variation for Resistance to Kernel Infection and Toxin Accumulation in Winter Wheat Infected with *Fusarium graminearum*. Phytopathology *102*, 306–314.

Warth B., Fruhmann P., Wiesenberger G., Kluger B., Sarkanj B., Lemmens M., Hametner C., Fröhlich J., Adam G., Krska R., 2015. Deoxynivalenol-sulfates: identification and quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat. Analytical and Bioanalytical Chemistry *407*, 1033–1039.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL).